



**UNIVERSIDAD DE CUENCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TÍTULO:**

DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE PAPILOMA BOVINO  
EN LESIONES DE ANIMALES AFECTADOS POR PAPILOMATOSIS CUTÁNEA

TESIS DE GRADO, PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

**AUTOR :** Lennin Enrique Sigüencia Santander C.I.0302087879.

**DIRECTOR:** Dr. Omar Santiago Andrade Guzmán C.I. 0102805496.

**COORDIRECTOR:** Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza.C.I. 0151059417.

**CUENCA, ECUADOR**

**2017**

## RESUMEN

La papilomatosis bovina es una enfermedad infecto-transmisible causada por uno o más de los 15 tipos de papiloma virus bovino, las lesiones se caracterizan por crecimientos neoplásicos dispersos o en grupos, localizados en los epitelios corporales queratinizados y no queratinizados. Así como también en las superficies mucosas del aparato digestivo y genitourinario, relacionado este último con el consumo crónico de helechos del género *Pteridium*. En el presente trabajo se planteó la identificación de material genético de los virus de papiloma bovino y su genotipificación, mediante las técnicas de biología molecular (PCR Y RFLP) para lo cual se efectuó la recolección de 40 muestras *post-mortem* de lesiones sugestivas de papilomatosis bovina, de 30 bovinos faenados en los camales de Cuenca, Paute y Azogues, además se colectaron 13 muestras *ante-mortem* de 11 animales de la provincia de El Oro. Las muestras positivas corresponden a lesiones presentes en el cuello, la ubre, morro y pabellón auricular. Los tipos que se encontraron con mayor frecuencia fueron el 3 y 6, seguido de los tipos 7 y 9. Además se visualizaron 4 tipos de patrones de restricción, uno de los cuales se repitió en 7 de las 18 muestras positivas, las mismas que no corresponden a los patrones predichos para cada uno de los 15 tipos de BPV. Con la detección y genotipificación de los tipos de papiloma virus bovino se puede realizar a posterior una vacuna multivalente como una herramienta profiláctica y terapéutica específica para los tipos de BPV que circulan en el Ecuador.

**Palabras claves:** Papilomatosis cutánea, Virus de papiloma bovino, Detección, Genotipificación.



## ABSTRACT

Bovine papillomatosis is an infectious-transmissible disease caused by one or more of the 15 types of bovine papilloma virus, the lesions are characterized by scattered neoplastic growths or in groups located in keratinized and nonkeratinized body epithelia. As well as in the mucous surfaces of the digestive and genitourinary tract, the latter related to the chronic consumption of ferns of the genus *Pteridium*. In the present work, the genetic material of bovine papilloma virus and its genotyping was identified using molecular biology techniques (PCR and RFLP) for which 40 postmortem samples were collected from lesions suggestive of papillomatosis bovine, of 30 cattle slaughtered in the camels of Cuenca, Paute and Azogues. In addition, 13 antemortem samples were collected from 11 animals from the province of El Oro. Positive samples correspond to lesions present in the neck, udder, canopy handset The most frequently encountered types were 3 and 6, followed by types 7 and 9. In addition, 4 types of restriction patterns were visualized, one of which was repeated in 7 of the 18 positive samples, the same as no correspond to the predicted patterns for each of the 15 types of BPV. With the detection and genotyping of bovine papilloma virus types, a multivalent vaccine can be carried out as a prophylactic and therapeutic tool specific to the types of BPV circulating in Ecuador.

**Keywords:** Cutaneous papillomatosis, Bovine papilloma virus, Detection, Genotyping.

**ÍNDICE:**

<b>Número:</b>		<b>Página:</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2</b>	<b>OBJETIVO ESPECIFICO</b>	<b>15</b>
<b>1.2</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	<b>Papilomatosis bovina</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Definición</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Etiología de papilomatosis bovina</b>	<b>17</b>
<b>2.1.3.</b>	<b>Clasificación taxonómica de los virus de papiloma bovino</b>	<b>18</b>
<b>2.1.3.1.</b>	<b>Características de las lesiones de papilomatosis bovina</b>	<b>19</b>
<b>2.1.4.</b>	<b>Epidemiología</b>	<b>21</b>
<b>2.1.5.</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>22</b>
<b>2.1.6.</b>	<b>Tratamiento y control</b>	<b>24</b>
<b>a.</b>	<b>Remoción quirúrgica</b>	<b>24</b>
<b>b.</b>	<b>Hemoterapia</b>	<b>24</b>
<b>c.</b>	<b>Terapias y profilaxis autógenas y no autógenas</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de lesiones de papilomatosis bovina para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1)</b>	<b>26</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Biológicos</b>	<b>26</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Reactivos y soluciones</b>	<b>26</b>
<b>3.1.3.</b>	<b>Equipos y otros materiales</b>	<b>26</b>
<b>3.2.</b>	<b>Métodos para realizar la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de lesiones de papilomatosis bovina para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1).</b>	<b>27</b>



<b>3.2.1.</b>	Pasos ejecutados	27
<b>3.3.</b>	Materiales a emplear para el procesamiento de las muestras de lesiones de papilomatosis bovina, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2)	27
<b>3.3.1.</b>	Biológicos	27
<b>3.3.2.</b>	Reactivos y soluciones	27
<b>3.3.3.</b>	Equipos y otros materiales	28
<b>3.4.</b>	Métodos aplicados para el procesamiento de las muestras de lesiones de papilomatosis bovina, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2)	28
<b>3.4.1.</b>	Pasos ejecutados	29
<b>3.5.</b>	Materiales usados para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3)	29
<b>3.5.1.</b>	Biológicos	30
<b>3.5.2.</b>	Reactivos y soluciones	30
<b>3.5.3.</b>	Equipos y otros materiales	31
<b>3.6.</b>	Métodos aplicados en la realización del proceso para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3)	31
<b>3.6.1.</b>	Pasos ejecutados	31
<b>3.7</b>	Materiales usados para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV de las muestras positivas, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4).	33
<b>3.7.1.</b>	Biológicos	33
<b>3.7.2.</b>	Reactivos y soluciones	33
<b>3.7.3.</b>	Equipos y otros materiales	34
<b>3.8.</b>	Métodos aplicados en la realización del proceso para la amplificación de	35

los productos de PCR específicos de los BPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4).

<b>3.8.1.</b>	Pasos ejecutados	35
<b>4.</b>	RESULTADOS	38
<b>4.1.</b>	Colecta de muestras.	38
<b>4.2.</b>	Detección de material genético de los BPV.	39
<b>4.3.</b>	Tipos de BPV identificados en las muestras positivas.	40
<b>4.4.</b>	Distribución de la localización de las lesiones positivas a BPV.	43
<b>5.</b>	DISCUSIÓN	45
<b>6.</b>	CONCLUSIONES	48
<b>7.</b>	PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES	49
<b>8.</b>	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
<b>9.</b>	ANEXOS	60

## ÍNDICE DE GRAFICOS

Número:		Página:
<b>Figura 1</b>	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al control de proceso.	40
<b>Figura 2</b>	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a muestras positivas a la presencia de material genético de BPV.	40
<b>Figura 3</b>	Electroforesis en gel de agarosa de los perfiles de digestión de los productos de PCR de muestras positiva a BPV (RFLP).	41
<b>Figura 4</b>	Distribución de la localización de las lesiones positivas a BPV.	43

## ÍNDICE DE TABLAS:

Número:		Página:
<b>Tabla 1:</b>	Preparación de la premezcla para la generación de los productos de PCR específicos para el control de proceso y de los BPV.	32
<b>Tabla 2:</b>	Tabla 2: Perfil de temperatura para generar amplicones o productos de PCR del control de proceso.	32
<b>Tabla 3:</b>	Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BPV.	33
<b>Tabla 4:</b>	Preparación de la premezcla para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP.	35
<b>Tabla 5:</b>	Perfil de temperatura para generar los productos de PCR de los BPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.	36
<b>Tabla 6</b>	Patrones de RFLP esperados de cada uno de los 15 tipos de BPV con las enzimas de restricción <i>DdeI</i> , <i>HinfI</i> , <i>MslI</i> y <i>HindIII</i> .	37



---

<b>Tabla 7</b>	Datos de las muestras recolectadas con lesiones sugestivas a papilomatosis.	38
<b>Tabla 8</b>	Resultados de la identificación de material genético de los BPV presente en lesiones de papilomatosis cutánea y su genotipificación.	42
<b>Tabla 9</b>	Distribución de la localización de las lesiones positivas a BPV.	44



**ÍNDICE DE ANEXOS:**

<b>Número:</b>		<b>Página:</b>
<b>Anexo 1</b>	Formato para la colecta de datos de los animales muestreados.	60
<b>Anexo 2</b>	Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso.	61
<b>Anexo 3</b>	Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de los BPV.	62

**ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA**

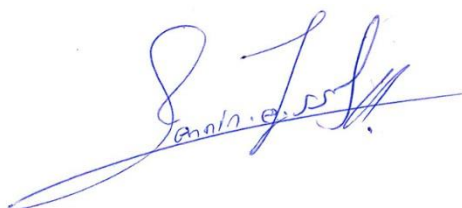
<b>Abreviatura:</b>	<b>Significado:</b>
ADN	Acido desoxirribonucleico
BPV	Papiloma virus Bovino
VPH	Papiloma virus Humano
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
RFLP	Polimorfos en la longitud de los fragmentos de restricción
<b>Símbolo:</b>	<b>Significado:</b>
nm	Nanómetros
ul	Microlitros

## CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACION PARA PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

**LENNIN ENRIQUE SIGUENCIA SANTANDER**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de la titulación “**Detección y genotipificación molecular del virus de papiloma bovino en lesiones de animales afectados por papilomatosis cutánea**”, de conformidad con el Art. 114 del CODIGO ORGANICO DE LA ECONOMIA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACION reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional, de conformidad a lo dispuesto en el el Art. 144 de la ley ORGANICA de Educación Superior.

Cuenca, 11 de septiembre de 2017



-----  
**LENNIN ENRIQUE SIGÜENCIA SANTANDER**  
**C.I:030208787-9**

## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

**LENNIN ENRIQUE SIGUENCIA SANTANDER**, autor del trabajo de titulación “**Detección y genotipificación molecular del virus de papiloma bovino en lesiones de animales afectados por papilomatosis cutánea**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 11 de septiembre de 2017



---

**LENNIN ENRIQUE SIGÜENCIA SANTANDER**  
**C.I:030208787-9**



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Omar Andrade, Director del presente trabajo de investigación, de manera especial al Dr. Antonio J. Vallecillo, Coodirector por su ayuda y apoyo incondicional.

A la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias – Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Cuenca. A la Dirección de Investigación de la Universidad de Cuenca (DIUC) por el financiamiento otorgado.

A los camales Municipales de Azogues, Cuenca y Paute.

**Lennin Enrique Sigüencia Santander**



## **DEDICATORIA**

A mis padres Enrique Sigüencia y Lourdes Santander por siempre brindarme su apoyo e inculcarme enseñanzas de responsabilidad para lograr conseguir mis metas personales.

A mis hermanas Silvia e Irene por constituir un ejemplo de lucha y superación. A Karina Rodriguez por siempre apoyarme en los momentos más difíciles.

**Lennin Enrique Sigüencia Santander**

## 1. INTRODUCCIÓN

La papilomatosis bovina es una enfermedad viral de carácter infecto-transmisible caracterizada por provocar alteraciones a nivel de la piel y las mucosas que están revestidas por epitelio estratificado plano queratinizado y no queratinizado (White & Howley, 2013; De Melo T.C., et al, 2011). Su agente causal es un virus, denominado virus del papiloma bovino (BPV). Entre los efectos que genera la papilomatosis se encuentra la formación de lesiones neoplásicas benignas denominadas papilomas o fibropapilomas, las lesiones tienden a ser múltiples y se ubican principalmente en la cara, cuello, espalda, tronco, ubre, pezones, incluso en el esófago, rumen y vejiga urinaria (Bocaneti et al., 2014; De Araldi, R.P., et al., 2014). Además puede causar ceguera, desarrollo retardado, problemas de infertilidad, desvalorización del cuero del animal debido a su apariencia y consecuentemente la disminución del valor de los animales al momento de la comercialización (Bocaneti F., et al, 2014).

En ocasiones los papilomas pueden progresar a la malignificación, o a la desaparición de la infección cuando el sistema inmune del animal logra controlar la infección. En el Ecuador la papilomatosis bovina perjudica significativamente la producción de los hatos ganaderos, generando pérdidas económicas a los propietarios (Borzacchiello et al., 2008).

A más de las afecciones de la piel algunos tipos de virus están relacionados con el desarrollo de hematuria vesical enzoótica bovina junto a la intoxicación con Ptaquilosido originada por la ingesta aguda de helechos del género *Pteridium*. En el momento en que los bovinos afectados por papilomatosis consumen los helechos, los mismos que poseen otro compuesto inmunosupresor que favorece la infección, lo que favorece el desarrollo y la evolución de neoplasias malignas (Aguilar, J. M., & C. Alvarado. 2006).

Para el tratamiento y prevención de esta infección viral se han utilizado estrategias no inmunológicas e inmunológicas, dentro de las primeras se encuentran acciones como la remoción quirúrgica, y en las segundas la hemoterapia, terapia con auto antígenos, y los no autógenos, éstos últimos antígenos se han sido elaborados a partir de material genético obtenido de los papilomas o fibropapilomas (Cantú, D. 2014).

En la actualidad en el Ecuador no se cuenta con vacunas específicas contra la papilomatosis bovina; ya que se desconoce cuál o cuáles de los 15 tipos de BPV descritos en varias investigaciones, son los agentes causales más frecuentes de las lesiones encontradas a nivel de la piel de los animales (Charry-Dávalos J.V. & M.F. Hinojosa-López. 2011).

En el país son escasos los estudios desarrollados con respecto a esta enfermedad. Es por ello que se planteó efectuar esta investigación orientada a detectar y genotipificar el o los tipos de BPV que se presentan con mayor frecuencia en los animales afectados por papilomatosis cutánea que son faenados en los camales municipales de Azogues, Cuenca y Paute.



Para la detección y genotipificación se emplearon las herramientas de biología molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ésta técnica tiene como finalidad obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) particular, partiendo de una copia del fragmento original o molde, y PCR-RFLP (Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción) la cual se refiere a la determinación del patrón de fragmentos y su longitud, obtenidos al digerir un fragmento de ADN generado mediante amplificación por PCR (Carvalho R.F., *et al*, 2013).

## 1.1. OBJETIVOS

### 1.1.1. Objetivo general

- Implementar técnicas de biología molecular para identificar y genotipificar los diferentes tipos de virus de papiloma bovino que afectan la piel de animales con lesiones compatibles a papilomatosis bovina, que son faenados en los camales Municipales de Azogues, Cuenca y Paute, lo que permitirá estimar la frecuencia de presentación de cada uno de los tipos de virus de papiloma bovino.

### ➤ 1.1.2. Objetivos específicos

Implementar y validar un ensayo de PCR para la identificación de ADN genómico de los diferentes tipos de virus de papiloma presentes en muestras de animales con lesiones sugestivas a papilomas cutáneos.

Implementar y validar un ensayo de RFLP para la identificación genotípica de cada uno de los diferentes tipos de virus de papiloma bovino hasta ahora descritos que afectan a estos animales.

Determinar la frecuencia, ubicación de los papilomas en el cuerpo del animal, así como los tipos de virus que se encuentran presentes en los bovinos que serán faenados en los camales municipales de Azogues, Cuenca y Paute.

## 1.2. HIPÓTESIS O PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

En las muestras de lesiones cutáneas obtenidas de bovinos afectados por papilomatosis bovina es posible detectar y genotipificar mediante las herramientas de biología molecular PCR-RFLP los 15 tipos de virus de papiloma descritos.



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Papilomatosis bovina

#### 2.1.1. Definición

El Papilomavirus Bovino (BPV) es el agente etiológico de la papilomatosis bovina, una enfermedad infecto-transmisible caracterizada por la presencia de lesiones neoplásicas benignas. La enfermedad no sólo afecta al tejido de la piel y de la mucosa, sino también puede contribuir al desarrollo de cáncer (Stocco dos Santos *et al.*, 1998).

Los BPV se han descrito a través de todo el mundo, y su transmisión puede ocurrir mediante contacto directo o indirecto entre los animales infectados o por contacto con fómites contaminados, tales como máquinas de ordeño, dispensadores de agua, comederos, cuerdas o vallas o transmitida por insectos (Love *et al.*, 2012).

La infección de BPV parte de una micro lesión, que expone el peptidoglicano de sulfato de heparina presente en la membrana plasmática, la misma que es el receptor que permite que se adhieran las partículas de BPV. La infección comienza en la capa basal del epitelio, donde el genoma viral se mantiene a un bajo número de copias, y depende de la diferenciación celular de los queratinocitos para continuar con el proceso de replicación viral (Mc.Bride *et al.*, 2012).

El BPV es un virus epiteliotrópico, con un genoma constituido por ADN de cadena doble. Provoca diversas enfermedades tumorales bovinas en todo el mundo (He *et al.*, 2013).

Los BPV adicional a ser reconocidos como los agentes causales de tumores benignos (papilomas cutáneos, fibroplasias) también están asociados a tumores malignos, tales como tumores de vejiga urinaria y el cáncer de esófago, causando pérdidas económicas significativas en el ganado (Bocaneti *et al.*, 2014).

Los viriones de BPV son pequeños (52-55 nm), sin envoltura, que se replican en el núcleo de las células epiteliales escamosas y en las verrugas de la piel y la mucosa de la mayoría de las especies de vertebrados superiores. Algunos tipos virales específicos tienen el potencial para causar la progresión maligna en lesiones papilomatosas de animales y seres humanos (Antonsson *et al.*, 2002; Villiers *et al.*, 2004).

En el ganado bovino el BPV es el agente etiológico de papilomas cutáneos y de pezón, cáncer del tracto gastrointestinal y de la vejiga urinaria (Field, 2002; Borzacchiello *et al.*, 2003; Wosiacki *et al.*, 2006).

El BPV produce lesiones macroscópicas caracterizados por aflorar hacia el exterior en proliferación o endofítico (en verted) y se componen de un epitelio hiperplásico por el apoyo del tejido dérmico discreta que contiene capilares dilatados (Ginn *et al.* 2007; Hargis *et al.*, 2012).

Es una enfermedad viral causada por un virus con genoma de ADN de la familia Papillomaviridae. Existen más de 300 tipos BPV, que se caracterizan por afectar a la especie humana y también a la mayoría de los animales domésticos excepto las aves (Johannsen & F.Lambert, 2013).

Además tienen afinidad por una especie determinada y por los tejidos, es por ello que lo considera como un virus oncogénico con tropismo mucoso-epitelial (White & Howley, 2013).

Estas afecciones se localizan en el epitelio cutáneo y mucoso de los animales y se les conoce como papilomas o verrugas. En los bovinos son considerados como tumores benignos y muchos tienen regresión espontánea antes de causar problemas al hospedero, provocando pérdidas económicas devastadoras en el ganado (Stocco dos Santos *et al.*, 1998).

Aunque algunas infecciones pueden progresar a la malignidad dando lugar a la aparición de carcinomas de células escamosas influenciados por otros factores ya antes mencionados (Dávalos & Hinojosa., 2011).

Los BPV son también causantes de tumores como el cáncer de vejiga urinaria y tracto digestivo superior (esófago) principalmente en bovinos que consumen helecho del género *Pteridium*. La papilomatosis bovina puede presentarse a cualquier edad, pero por lo general los animales más afectados suelen ser los terneros o animales jóvenes (Aguilar & Alvarado, 2006).

### **2.1.2. Etiología de papilomatosis bovina**

Los BPV se caracterizan por causar lesiones a diferentes especies, entre las cuales están los seres humanos y todos los animales domésticos excepto las aves. En el caso de los seres humanos se ha identificado los genomas completos de más 148 tipos de VPH (Virus de papiloma humano), también 112 tipos de virus papilomas en animales, estos últimos se clasifican en 32 géneros diferentes y que están disponibles las secuencias de los mismos en el GenBank (Doorslaer & Tan, 2012).

Los BPV son considerados como agentes causales de tumores benignos y malignos en los bovinos. Son virus sin envoltura, que poseen como genoma una molécula circular de ADN de cadena doble, contiene alrededor de 8000 nucleótidos o bases. La partícula viral, consta de 42 capsómeros y tiene alrededor de 50-60 nanómetros de diámetro. Este virus resiste al cloroformo y permanece latente 180 días a 70 °C y 90 días a 4 °C, se replica en el núcleo.

El genoma viral encuentra dividido en 3 regiones claramente definidas; una de ellas es la encargada de la codificación de proteínas o genes tempranos (E de Early); la segunda es la de proteínas estructurales o tardías (L de Late) y una tercera región que contiene los reguladores de la replicación y transcripción del genoma (Munday, 2014).

Es importante indicar que los BPV codifican alrededor de 8 proteínas, solo cuatro están altamente

conservadas entre los diferentes tipos, codificadas por todos los BPV; las proteínas reguladoras E1 y E2 modulan la transcripción, la replicación viral; y las proteínas estructurales L1 y L2 son componentes la cápside viral (Bergvall & Melendy, 2013).

Los estudios demuestran que la proteína E2 regula la replicación del ADN y actúa como un inhibidor de la transcripción de E6 y E7 (McBride *et al.*, 2012). También se demostró que la metilación de di-nucleótidos CpG, verificado como presente en el sitio de unión de E2, conduce a la inhibición de la transcripción E2, lo que resulta en la activación transcripcional E6 y E7 (Kim *et al.*, 2003).

El gen de la proteína E4 codifica una proteína tardía para la transcripción, replicación en una región designada región aguas arriba de reglamentación (URR) o el control a larga región (Bernard, *et al.*, 2010).

La E5, E6, y E7 son oncoproteínas que están involucrados en varias etapas de la transformación de las células infectadas, inducen alteraciones entre las que se encuentran incluidas aberraciones citogenéticas y la acción clastogénica. Esto conduce a la inestabilidad genómica, que se asocia directamente con la malignidad (Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2011; Araldi *et al.*, 2013).

Aunque el potencial oncogénico de BPV es bien conocido, los mecanismos cancerígenos de estos virus no se entienden completamente. Se sabe que el proceso oncogénico se inicia después de años establecida la infección (Araldi *et al.*, 2013).

El uso de ensayos de PCR con cebadores degenerados, seguida de secuenciación ha permitido la identificación de varios tipos de papilomavirus en huéspedes humanos, animales y otros. El conjunto FAP cebador de PCR fue diseñado a partir de dos regiones relativamente conservadas encontradas en el gen L1 y se ha demostrado para amplificar el ADN del BPV, así como también para tejido sano de muchas especies animales incluyendo a los bovinos. Se ha descrito que las verrugas cutáneas en los bovinos, son causados por tipos virales especie-específicas, los distintos tipos de BPV son asociados con diversas lesiones corporales (Dávalos & Hinojosa, 2011).

### **2.1.3. Clasificación taxonómica de los virus de papiloma bovino**

Según la clasificación del Comité Internacional de Taxonomía Viral, los virus se clasifican en 7 clases. Los virus de papiloma están en la primera clase (Virus con genoma de ADN de cadena doble), pertenecen a la familia Papillomaviridae que consta de 16 géneros de acuerdo a su organización genómica.

En la actualidad los BPV comprenden 15 tipos diferentes, que han sido bien caracterizados y clasificados en los géneros Deltapapillomavirus (BPV tipo 1, 2, 13 y 14) (Lunardi *et al.*, 2013; Munday *et al.*, 2015), Xipapillomavirus (BPV tipo 3, 4, 6, 9, 11 y 12) (Zhu *et al.*, 2012),

Epsilonpapillomavirus (BPV tipo 5 y 8) (Bernard *et al.*, 2010; Tomita *et al.*, 2007). El BPV tipo 7 no ha sido asignado pero se ha propuesto que sea asignado al género Dyoxipapillomavirus (Rector & Van Ranst, 2013).

Los BPV son conocidos por infectar tanto a los tejidos epiteliales y mesenquimales, y ser capaces de causar infección en otras especies de animales domésticos. La infección por BPV causa tumores en los caballos (Bergvall, 2013), cebras de montaña del cabo, jirafas y antílopes sable (Williams *et al.*, 2011; Van Dyk *et al.*, 2012). Además los BPV tienen un papel importante en el desarrollo de los tumores de vejiga en los búfalos (Pangty *et al.*, 2010; Somvanshi, 2011; Roperto *et al.*, 2013).

Comúnmente los BPV tipo 1, 2 y 13 están asociados con la carcinogénesis de vejiga en los bovinos adultos que pastan en tierras ricas en helecho común (Roperto *et al.*, 2015). Se conoce que esta planta contiene compuestos genotóxicos como el Ptaquilosido, y la Quercetina que tienen efectos inmunosupresores, mutagénicos y carcinogénicos (Campo *et al.*, 1992; Borzacchiello *et al.*, 2003; Peretti *et al.*, 2007).

El BPV tipo 14 es un virus cuyo genoma se ha determinado recientemente (Munday *et al.*, 2015). El ADN genómico del BPV tipo 14 se ha detectado en leones africanos cautivos en Australia (Orbell *et al.*, 2011). En sarcoides de felinos de América del Norte y Nueva Zelanda (Munday *et al.*, 2010) y en algunos fibropapilomas, así como en lesiones inflamatorias cutáneas en el ganado vacuno en Florida (Munday & Knight, 2010). Como algunas evidencias sugieren que el BPV tipo 14 es un virus oncogénico (Munday *et al.*, 2015), se ha planteado la hipótesis de que este virus podría contribuir al desarrollo de los tumores de vejiga en el ganado bovino.

#### **2.1.3.1. Características de las lesiones de papilomatosis bovina**

Las lesiones causadas por la infección de los BPV generalmente se ubican en la ubre y pezones, cabeza, cuello, y hombros, y en otros casos se las ha encontrado en el omaso, vagina, vulva, pene, ano. Los BPV tipo 1, 2 y 5, provocan lesiones de pezón, verrugas cutáneas comunes y fibropapilomas en forma de granos de arroz, presentan una cubierta fibrosa de profundidad variable en el epitelio escamoso estratificado, cuyas capas superficiales están queratinizadas. Las lesiones pueden variar de tamaño, desde pequeños nódulos firmes hasta grandes crecimientos en forma de coliflor. Son de color grisáceo o negro, duro y espinoso al tacto. Las lesiones más grandes son susceptibles a abrasión y pueden sangrar (Borzacchiello, 2008).

Los tipos BPV 3, 4 y 6 producen lesiones cutáneas y epiteliales sin proliferación de fibroblastos. Los papilomas causados por BPV tipo 3 son persistentes, planos y de base ancha, a diferencia de los fibropapilomas que protruyen y son pedunculados. Las afecciones por BPV tipo 4 se desarrollan solamente a nivel de mucosas gastrointestinales y vesicales, pueden favorecer el

desarrollo de carcinomas de células escamosas (Campo, 2003).

Aunque las lesiones del papiloma se encuentran en los pezones y ubres pueden ser causadas por diversos tipos de BPV, el tipo 6 es el que más a menudo se ha identificado en ésta localización anatómica. Sin embargo, la infección por los tipos BPV 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10 y 11, y otros tipos puede presentarse en las glándulas mamarias del ganado (Jarreté *et al.*, 1984; Campo *et al.*, 1992; Ogawa *et al.*, 2004; Claus *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2007; Noel *et al.*, 2008).

A los BPV no se les puede aislar y cultivar de la misma forma que el resto de los virus, y la diferenciación de los tipos se basa en las características de las lesiones, análisis de ADN, hibridación y PCR.

En resumen, en los bovinos hasta el momento se conocen 15 tipos diferentes de BPV, los que causan diferentes tipos de lesiones. En el caso del BPV tipo 1 causa papilomas frondosos de la piel de pezones y fibropapilomas en el pene; junto con el BPV tipo 2, fibropapilomas de la piel de la zona anteroventral del cuerpo, incluyendo la frente, cuello y espalda, llamadas verrugas comunes. Adicionalmente el BPV tipo 2 es responsable fibropapilomas en forma de coliflor en la piel ventral del abdomen y región anogenital. Se asocia con cáncer de vejiga en los bovinos.

El BPV tipo 3 se asocia a papilomas cutáneos; el BPV tipo 4 a papilomas de esófago, pre estómagos, estómago glandular e intestino delgado. Puede favorecer la malignificación de éstas lesiones sobre todo en animales que consumen hebrecho. En general el BPV tipo 4 tiene especificidad por el tracto gastrointestinal superior y ocasiona papilomas orales, principalmente en animales adultos.

En los casos del BPV tipo 5 es causa de fibropapilomas en forma de granos de arroz en la ubre; del BPV tipo 6 se conoce que causa papilomas epiteliales frondosos, en la ubre y pezones; y el BPV tipo 7 se ha aislado de papilomas cutáneos y también a partir de muestras de piel de pezones sanos (Villiers *et al.*, 2004).

Es por ello que la papilomatosis bovina se ha presentado en los rebaños lecheros de todo el mundo como un problema de salud del ganado que provoca pérdidas económicas (Field, 2003). Por lo que el ordeño puede llegar a ser difícil en los bovinos notoriamente afectados, la presencia de ulceración y rotura de las lesiones cutáneas establecidas podrían predisponer a las vacas lecheras a la mastitis y la distorsión de los conductos de la leche. Además, el mantenimiento de vacas afectadas con alteración en la glándula mamaria incluso en rebaños con un elevado número de animales afectados pueden reducir las ganancias económicas en la industria láctea (Campo, 2002; Borzacchiello *et al.*, 2008). En otros animales se ha relacionado a los BPV con la presencia de sarcoide, como en los equinos, felinos y cáncer de oreja en las ovejas (Falah *et al.*, 2000).

#### 2.1.4. Epidemiología

En la papilomatosis bovina el virus es excretado en las células descamadas de la epidermis de animales infectados y se transmite por contacto directo con éstas, o con objetos inanimados contaminados, como sogas, agujas, narigueras, equipo de areteo, tijeras de descorne, postes, las manos humanas e incluso se sugiere por acción de vectores artrópodos.

En los elementos contaminados el virus puede mantenerse activo por varios días e infectar a los animales cuando estos se frotan entre ellos (Cantú, 2014).

Se ha descrito que es común que los animales que son sometidos a acicalamiento (*grooming*) para exposiciones desarrollen lesiones extensas, por otro lado se sugiere que la transmisión sexual es posible en procesos reproductivos. También se ha reportado que a nivel perianal la transmisión ocurre por examen rectal durante chequeos ginecológicos, sobre todo en vacas. La presencia de ADN en fluidos corporales como leche, sangre y semen sugiere que la transmisión de los BPV por otros medios, además del contacto directo con epitelio o instrumentos contaminados. La monta y la lactancia son los principales medios para el intercambio directo de fluidos corporales entre el ganado, por lo que son mecanismos muy importantes para la transmisión de los BPV (Yagui *et al.*, 2006).

El proceso de la enfermedad se relaciona directamente con una débil respuesta inmunológica. Los papilomas se presentan luego de que el virus ha ingresado en el hospedero, a través de abrasiones o heridas en la piel. La infección de las células epiteliales lleva al desarrollo de hiperplasia, seguida de degeneración epitelial e hiperqueratinización. Estos cambios se presentan luego de 4 a 6 semanas después de establecida la infección inicial (Campo M. (2003). Las lesiones hiperplásicas iniciales se describen como verrugas, papilomas o condilomas, que usualmente son benignas, pero pueden experimentar una transformación neoplásica maligna influenciada principalmente por factores ambientales. El virus infecta los queratinocitos basales y replican su genoma en las capas diferenciadas espinosa y granular, provocando el crecimiento excesivo de las verrugas. El tumor contiene tejido epitelial y conectivo, puede ser un papiloma o fibropapiloma dependiendo si contiene poco tejido conectivo o tejido fibroso con poco tejido epitelial respectivamente. Los papilomas se producen como resultado de una hiperplasia celular sin producción de antígenos virales (Brandt S., *et al.*, 2011). Puede desarrollarse una infección latente a nivel cutáneo y de linfocitos. Los fibropapilomas o verrugas persisten por al menos 4-6 meses antes de que ocurra la regresión espontánea y simultánea. Las fases en los patrones de desarrollo comprenden; en la fase 1, los papilomas aparecen como placas ligeramente elevadas luego de 4 semanas de la infección. En la fase 2, las lesiones se caracterizan por ser fitopatológicas, con replicación viral y con agregados cristalinos de viriones que se pueden observar a las 8 semanas después de la infección (Burnett S., *et al.*, 1992). En la fase 3 los



papilomas presentan fases pedunculadas y fibroticas, con superficies duras, lobulares y fungiformes que aparecen a las 12 semanas. El nivel de los anticuerpos neutralizantes parece estar relacionado con la regresión de lesiones y con la protección contra la reinfección. El progreso de las lesiones a la malignidad es consecuencia de las acciones virales oncogénicas dentro del huésped, que corresponden a los genes tempranos. Se ha dicho que el virus de BPV se ha caracterizado por ser un virus epiteliotropo, se sugiere que puede también encontrarse en otros fluidos corporales como sangre completa, (pudiendo ser los linfocitos el sitio de latencia del virus), plasma, leche, calostro, placenta, y líquido amniótico (Babaahmady & Taherpour, 2011).

### 2.1.5. Diagnóstico

Los estudios que incluyen técnicas de diagnóstico del BPV han atraído un gran interés debido a los problemas causados por la infección viral, tales como la dermatitis y cáncer, lo que resulta en impactos económicos significativos en el ganado (Nascimento *et al.*, 2012). Por otra parte, los resultados obtenidos a través de técnicas de diagnóstico permiten extraer una epidemiología molecular de las infecciones, lo que tiene importancia profiláctica, ya que la inmunidad es específica de especie (Noel *et al.*, 2009). El número limitado de tipos de BPV en comparación con el VPH refleja un pequeño tamaño de la muestra analizada y no una falta de diversidad antigénica para BPV (Noel *et al.*, 2009).

Las técnicas de diagnóstico incluyen el examen clínico, histopatología como un diferencial y diagnóstico complementario (Betiol *et al.*, 2012), y la detección de secuencias de ADN virales por una serie de técnicas tales como *Southern blot* y la hibridación *in situ* de sondas con marca radiactiva (Leto *et al.*, 2011). El uso de anticuerpos monoclonales contra epítomos de BPV también pueden proporcionar un diagnóstico mediante herramientas inmunohistoquímicas (Elzein *et al.*, 1991).

El análisis histopatológico de la lesión es un procedimiento importante, ya que permite identificar tumores intra-epiteliales asociados con virus oncogénicos, como las causadas por BPV, haciendo de esta una herramienta complementaria en el diagnóstico molecular (Turk *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2008; Leto *et al.*, 2011). El análisis histopatológico también indica una predilección por las zonas anatómicas y topográficas relacionadas con los tipos virales específicas (Monteiro *et al.*, 2008). Los hallazgos patológicos incluyen hiperplasia de las células de la capa espinosa (acantosis), hiperqueratosis, paraqueratosis, papilomatosis y koilocitosis (Turk *et al.*, 2005; Anjos *et al.*, 2010; Marins & Ferreira, 2011). Aunque koilocitosis está presente en el tejido infectado por el BPV, esto no se considera un marcador patognomónico (Marins & Ferreira, 2011).

El diagnóstico clínico se realiza mediante la observación de las lesiones clínicas, papilomas o fibropapilomas cutáneos y de límite cutaneomucoso, son fáciles de reconocer ya que son características de la enfermedad. Sin embargo si los signos no son patognomónicos, la

histopatología de biopsias es confirmativa. Dentro de las pruebas para el diagnóstico de la infección por BPV destacan la citopatología, histopatología. También se realizan pruebas de PCR para detectar el ADN de los PV causantes de la lesión (Vásquez *et al.*, 2012).

La PCR ha demostrado ser un método más sensible para la identificación y caracterización de los BPV, mediante el uso de oligonucleótidos o primers degenerados (Borzacchiello *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2004; Jelínk & Tachezy, 2005; Monteiro *et al.*, 2008; Leto *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2012.; Zhu *et al.*, 2012). El diagnóstico molecular por PCR también se puede acompañar ensayos como el RFLP, una técnica que emplea la fragmentación de segmentos amplificados del gen de L1 mediante el uso de endonucleasas o enzimas de restricción (Carvalho *et al.*, 2013), con lo cual se puede diferenciar cada uno de los 15 tipos de BPV.

El gen L1, que codifica la principal proteína de la cápside L1, es el gen más conservado dentro del genoma del virus del papiloma y por lo tanto se ha utilizado para la identificación de nuevos tipos virales durante los últimos 15 años (Villiers *et al.*, 2004). Las divergencias en la secuencia de nucleótidos del ORF de L1 se utilizan como criterio de clasificación taxonómica, y el uso de los ensayos de PCR con primers degenerados, seguido por secuenciación, ha permitido la identificación de varios tipos de PV en hospederos humanos y animales (Forslund *et al.*, 1999). El uso de primers específicos también se ha empleado con éxito, principalmente para la identificación de BPV en la sangre (Araldi *et al.*, 2013). Los primers FAP ampliamente usados para la detección de PV, fueron diseñados a partir de dos regiones relativamente conservadas que se encuentran en el gen de L1 y se han empleado para amplificar el ADN de BPV tanto en papiloma y la piel sana de muchas especies animales, incluyendo ganado vacuno (Ogawa *et al.*, 2004). Los cebadores FAP59 / FAP64, se basan en las secuencias del gen de la proteína de la cápside del VPH L1, se han utilizado con éxito para diferenciar la mayoría de virus del papiloma incluyendo BPV (Antonsson & Hansson, 2002). De acuerdo con el estudio de Villiers *et al.*, (2004), si la identidad del gen L1 del BPV en el virus identificado es menor de 90%, se considera que es un nuevo tipo; si la identidad es de entre 90 y 98%, se considera como un subtipo; y si la identidad es de más de 98%, se clasifica como una variante. Los estudios han demostrado que diferentes tipos de BPV infectan tejidos específicos y causan lesiones específicas (Borzacchiello & Roperto, 2008). Sin embargo, también hay informes que muestran que el tipo de BPV detectados no son muy específicos o la lesión no es específica (Batista *et al.*, 2013).

Los BPV se han detectado en Brasil en las últimas décadas, los informes disponibles en diferentes regiones del país indican una diversidad significativa de los tipos virales, lo que implica la carga de enfermedad evidente (Yagui *et al.*, 2008; Noel *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012; Lunardi *et al.*, 2013). Por lo tanto, es un criterio para la identificación de los distintos tipos de BPV y su



prevalencia, la distribución y las consecuencias clínicas para el desarrollo de profilácticos y/o procedimientos terapéuticos.

### **2.1.6. Tratamiento y control**

Las tasas de prevención y recuperación con los tratamientos son muy complicadas de valorar, ya que la enfermedad es autolimitante y de duración variable (Charry-Dávalos J.V. & M.F. Hinojosa-López. (2011).

Se ha empleado una serie de tratamientos que comprenden desde la remoción quirúrgica y cauterización, hemoterapia, autovacunas (autoantígenos) preparadas mediante la inoculación de tejidos macerados de verrugas tratados con formalina. Las vacunas fabricadas con proteínas de la cápside viral son efectivas pero solo para un tipo específico de virus (Cantú, D. 2014).

#### **a. Remoción quirúrgica**

Comprende la extirpación de algunas verrugas lo que puede estimular el sistema inmune y provocar la caída de otras formaciones semejantes. La cauterización permite la reabsorción de tejido rico en virus y si el animal tiene madurez inmunológica e inmunocompetencia tiende a curarse secundariamente al estímulo desencadenado (Love A.J., *et al*, 2012).

La escisión de los papilomas seguida de la aplicación tópica de Formalina al 10% da buenos resultados en el tratamiento de pezones y ubres. También se ha empleado productos corrosivos como Ácido sulfúrico, Nitrato de plata, bastones de soda, y productos homeopáticos para la cauterización de las lesiones (Ruiz V., *et al*, 2015).

En lo se refiere a la presencia de papilomas en el pene lo más indicado es la remoción quirúrgica, en cuanto a la vulvogenital se recomienda descartar inmediatamente a los enfermos (Elzein E.T., *et al*, 1991).

#### **b. Hemoterapia**

Promueve un estímulo proteínico inespecífico, y consiste en la absorción de la sangre venosa, el sistema inmune es activado y empieza a producir anticuerpos contra el papiloma, lo que lleva a la eliminación de la enfermedad (Silva M.A., *et al*, 2013).

El procedimiento comprende la extracción de sangre de la vena yugular o caudal con o sin anticoagulante, para luego aplicar por vía intramuscular o subcutánea utilizando 4 dosis de 20 ml de sangre con un intervalo de una semana, alcanzando una eficacia del 50% (Díaz R.V. *et al*, 2012).

### c. Terapias y profilaxis autógenas y no autógenas

Este tipo de terapias poseen efecto curativo y preventivo siendo la medida de control más indicada. Pero las vacunas comerciales son menos eficaces ya que pueden no contener el tipo de antígeno apropiado. El inconveniente para producir una vacuna autógena es recolectar las lesiones un tanto pequeñas en los pezones, a no ser que se recojan docenas de verrugas (Ndarathi & Mbuthia, 1994). La vacuna se prepara a partir de tejido verrugoso homogenizado que se filtra y se inactiva con Formol. Es por ello que se puede seleccionar según el tipo de tumor, localización, y composición histológica, estadio del desarrollo de la enfermedad, ya que los virus están presentes en mayor concentración en el tejido epitelial de las verrugas más antiguas que en las recientes. Los resultados satisfactorios se obtienen luego de tres a seis semanas en el 80-85% de los casos cuando las verrugas están en la superficie del cuerpo o en el pene de los animales, pero solo un 33% cuando están en los pezones (Duran *et al.*, 2012).

En el Ecuador no existe una vacuna multivalente efectiva contra la papilomatosis bovina. Es por ello que esta investigación se encaminará a realizar la identificación y genotipificación de los diferentes tipos de BPV que afectan a los animales en estudio, para posterior a ello fabricar una vacuna multivalente con los tipos de BPV más frecuentes que afectan a los animales.

En el estudio desarrollado por Ruiz *et al.*, (2015) relacionado a la obtención de vacunas, la investigación determinó que la proteína principal de la cubierta del papilomavirus (L1) puede auto-ensamblarse en partículas semejantes a VLP (*Virus- particle like*) altamente inmunogénicas (Love *et al.*, 2012).

La expresión de la proteína L1 en *Nicotiana benthamiana* con el vector pEAQ (Sainsbury *et al.*, 2009), con rendimientos de 183 mg/kg de tejido de la hoja en peso fresco, y de las cuales las VLP de alta pureza fueron capaces de inducir una fuerte respuesta inmune en los conejos inoculados. En este trabajo, el rendimiento de proteína excede el nivel básico requerido para la producción económica de una vacuna con lo que ésta planta es una excelente candidato para producir potenciales vacunas contra los BPV. Sin embargo, en otros intentos de la expresión transitoria de VLP en plantas han sido difíciles debido a los bajos rendimientos (Thuenemann *et al.*, 2013).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se indican los materiales y los métodos que se usaron y aplicaron en cada una de las actividades planificadas para el proyecto de titulación.

#### **3.1. Materiales para la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de lesiones de papilomatosis bovina para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1):**

##### **3.1.1. Biológicos**

Se colectaron 53 muestras de 41 bovinos que presentaron papilomas a nivel cutáneo y mucosas del aparato digestivo.

##### **3.1.2. Reactivos y soluciones**

**Solución de conservación** (Solución al 90% de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661), pH 8.0; 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.: G5516)).

**Solución TE 10:1 100X** (Solución de 1 M de Tris-HCl, pH 8.0 y 100 mM de EDTA).

**Solución a 2 M de Tris-HCl, pH 8.0.**

**Solución a 500 mM de EDTA, pH 8.0.**

##### **3.1.3. Equipos y otros materiales**

**Platina de calentamiento con agitación magnética.**

**Potenciómetro (pHmetro).**

**Set de micropipetas** (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

**Autoclave.**

**Equipo de filtración** (Ø 0.22 nm).

**Probetas y recipientes para soluciones.**

**Recipientes para las muestras** (Tubos Falcon de 15 ml).

**Kit de disección.**

**Guantes.**

**Solución desinfectante** (Etanol al 70%).

**Caja térmica para el transporte de muestras.**

**Formatos para la colección de la muestra (Anexo 1).**

### **3.2. Métodos para realizar la colecta, conservación, transporte, y almacenamiento de las muestras biológicas de lesiones de papilomatosis bovina para la obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 1):**

#### **3.2.1. Pasos ejecutados**

**Paso 1.** Se prepararon las soluciones requeridas.

**Paso 2.** Se colocaron en los recipientes para las muestras 8 ml de la solución de conservación de la muestra.

**Paso 3.** Se tomaron las muestras *post-mortem* de bovinos con papilomatosis cutánea faenados en los camales Municipales de Azogues, Cuenca y Paute, de acuerdo a la normativa del manejo respetuoso de los animales y así como también tomando las seguridades del caso para la viabilidad de las muestras en estudio.

**Paso 4.** Para la colecta se tomó una cantidad máxima de tejido de la lesión no mayor a la necesaria para llegar a tener un volumen de 10 ml (Marcado en el recipiente el volumen de 10 ml). El tejido se colectó en secciones de tejidos no mayor a 2 mm de grosor.

**Paso 5.** Se identificaron el o los recipientes y colectaron los datos necesarios para llenar el formato de datos para la colecta de las muestras.

**Paso 6.** Para el transporte de las muestras se procedió a colocar los recipientes en una caja térmica, evitando que se vuelquen y se generen derrames.

**Paso 7.** Para el almacenado de las muestras, se colocó los recipientes en refrigeración (4 °C). Con este procedimiento se pueden mantener viables las muestras por un periodo de 6 a 8 meses para la obtención del material genético.

### **3.3. Materiales a emplear para el procesamiento de las muestras de lesiones de papilomatosis bovina, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2):**

#### **3.3.1. Biológicos**

Muestras de tejido colectado de las lesiones de papilomatosis bovina mantenidas en la Solución de conservación a 4°C.

#### **3.3.2. Reactivos y soluciones**

**Solución de lisis** (Solución con 10 mM de Tris-HCl, pH 7.4 y 0.5 % de SDS (Sigma, Cat. No.: 71725). La solución ya preparada se almacenó a temperatura ambiente protegida de la luz solar directa.

**Solución de proteinasa K** (Solución con 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. No: P2308) en 10

mM de Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM de EDTA y 50% de Glicerol). La solución ya preparada se fraccionó en alícuotas de 500 µl y se almacenaron a – 20 °C, protegidas de la luz.

**Solución de Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1** (Sigma, Cat. No: 77619). De igual manera ésta solución se almacenó en refrigeración y protegido de la luz.

**Solución de Etanol al 100 %** (Sigma, Cat. No: E7023). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

**Solución de Etanol al 70 %** (Solución al 70 % de Etanol en agua). Almacenada en refrigeración y protegido de la luz.

**Solución TE 10:1 1X** (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA).

**Agarosa** (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

**Solución buffer TAE 1X** (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

**Solución de Bromuro de Etidio** (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

**Solución Buffer de carga para ADN 6X** (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

**Marcador de peso molecular para ADN** (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

### 3.3.3. Equipos y otros materiales

**Set de micropipetas** (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles).

**Vortex.**

**Centrifuga refrigerada.**

**Fuente de poder.**

**Cámara de electroforesis horizontal.**

**Balanza analítica** (Mantener calibrada).

**Transiluminador UV.**

**Fotodocumentador UV-impresora.**

**3.4. Métodos aplicados para el procesamiento de las muestras de lesiones de papilomatosis bovina, extracción y purificación de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total (Actividad experimental número 2):**

### 3.4.1. Pasos ejecutados

**Paso 1.** Se tomó una porción aproximada de  $\approx 100$  mg de la muestra de tejido colectado de las lesiones de papilomatosis bovina y mantenidas previamente en la Solución de conservación a 4 °C.

**Paso 2.** Se colocó la muestra de tejido sobre una porción de absorbente papel estéril para que se eliminara la mayor cantidad de la Solución de conservación.

**Paso 3.** Se colocó la muestra de tejido en un tubo eppendorf de 2.0 ml y se adicionó 400  $\mu$ l de la Solución de lisis y 100  $\mu$ l de la Solución de Proteinasa K (5 mg/ml).

**Paso 4.** La muestra se incubó a 56 °C en un baño María durante toda la noche (12 a 14 h).

**Paso 5.** Una vez concluido el proceso de digestión, se adiciono 500  $\mu$ l de la Solución de Fenol/Cloroformo/A. Isoamilico 25:24:1 y se mezcló vigorosamente con el vortex durante 20 a 30 s.

**Paso 6.** La suspensión obtenida se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación se colectó el sobrenadante ( $\pm 400$   $\mu$ l) y se procedió a colocarlo en un tubo eppendorf (1.5 ml) nuevo.

**Paso 7.** A la muestra colectada se la adicionó 2.4 volúmenes de Etanol al 100% (1 ml) y se mezcló invirtiendo el tubo por 8 a 10 veces.

**Paso 8.** La mezcla se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min a 4 °C. Una vez concluida la centrifugación se eliminó la solución de forma cuidadosa para no perder la pastilla del ADN precipitado. Se adicionó 500  $\mu$ l de la Solución de Etanol al 70%, y se repitió el proceso de centrifugación y eliminación completa de la Solución de Etanol al 70%.

**Paso 9.** La pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente, protegida de la luz y el polvo. Y posteriormente fue resuspendida en 50  $\mu$ l de la Solución buffer TE 10:1 1X, pH 8.0.

**Paso 10.** Las muestras de ADN total obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta que se emplearon en los procesos de amplificación.

**Paso 11.** Previo a realizar los ensayos de amplificación con el control de proceso (Detección de ADN genómico de bovino) se evaluó la presencia e integridad del material genético purificado mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio.

**3.5. Materiales usados para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3).**

### 3.5.1 Biológicos

Muestras de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total puro, extraído de las muestras de tejidos de las lesiones de los animales afectados por papilomatosis bovina.

### 3.5.2. Reactivos y soluciones

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Se preparación de alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas del polvo.

**Enzima Taq ADN polimerasa** (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033), con la **Solución buffer de amplificación 10X** y la **Solución a 50 mM de MgCl<sub>2</sub>**. Se prepararon alícuotas de las soluciones y se almacenaron a -20 °C, protegidas de la luz directa.

**Solución de dNTP's 10 mM** de cada uno (Trifosfato de Desoxinucleotidos) (dNTP's set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C y protegidas de la luz directa.

**Solución de oligonucleótidos o primers 100 µM** (Invitrogen). Par de oligonucleótidos específicos para el control de proceso (12SFWMo: **TAA ATC TCG TGC CAG CCA**, 12SREVMo: **AGT ATG CTT ACC TTG TTA CGA C**), y para la detección de material genético de los BPV (FAP59For: **TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT**, FAP64Rev: **CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC**). Se resuspendieron en agua grado biología molecular para tener una concentración final de 100 µM y prepararon alícuotas que se almacenaron a -20 °C protegidas de la luz directa.

**Soluciones de ADN total:** ADN total obtenido de lesiones de bovinos afectados por papilomatosis bovina, siguiendo el proceso antes descrito (**Sección 7.3**). Las alícuotas se mantuvieron almacenadas a -20°C y protegidas de la luz directa.

**Agarosa** (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

**Solución buffer TAE 1X** (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

**Solución de Bromuro de Etidio** (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

**Solución Buffer de carga para ADN 6X** (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

**Marcador de peso molecular para ADN** (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

### 3.5.3. Equipos y otros materiales

**Set de micropipetas** (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)

**Vortex.**

**Microcentrifuga refrigerada.**

**Cabina de PCR.**

**Termociclador Nexus** (Eppendorf).

**Congelador a -20°C**, sin descongelamiento automático (Almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).

**Fuente de poder.**

**Cámara de electroforesis horizontal.**

**Balanza analítica** (Mantener calibrada).

**Horno de microondas.**

**Transiluminador UV.**

**Fotodocumentador UV-Impresora.**

**Potenciómetro** (pHmetro).

**Platina de agitación y calentamiento.**

**3.6. Métodos aplicados en la realización del proceso para la generación de los productos de PCR específicos del control de proceso y de los BPV, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 3).**

#### 3.6.1. Pasos ejecutados

**Paso 1.** Se descongelaron los reactivos necesarios para la amplificación (Agua grado biología molecular, Solución buffer de amplificación 10X, Solución de dNTP's, Solución de MgCl<sub>2</sub>, Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes a las muestras a analizar).

**Paso 2.** Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, se preparó una premezcla con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (25 µl de volumen final por reacción), colocando en el orden indicado los siguientes reactivos, con la excepción de las muestra de ADN total:



**Tabla 1: Preparación de la premezcla para la generación de los productos de PCR específicos para el control de proceso y de los BPV.**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	por reacción:	de premezcla*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	18.65 µl	18.65 µl X n
Solución buffer de amplificación 10X	10X	1X	2.5 µl	2.5 µl X n
Solución de dNTP's	10 mM	0.1 mM	0.5 µl	0.5 µl X n
Solución de MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2.0 mM	1.0 µl	1.0 µl X n
Oligonucleótido 12SREVMod o FAP59For	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl X n
Oligonucleótido 12SREVMod o FAP64Rev	100 µM	0.8 µM	0.2 µl	0.2 µl X n
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/µl	0.04 U/µl	0.2 µl	0.2 µl X n
Muestra de ADN total	---- µg/µl	---- µg/µl	2.0 µl	2.0 µl X n
Volumen final:	-----	-----	25 µl	25 µl X n

\* n = Número de muestras.

**Fuente: Autor**

**Paso 3.** La premezcla preparada se mezcló en el vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

**Paso 4.** Se marcaron los tubos de PCR (200 µl) y les fue colocado 23 µl de la premezcla y se les adicionó 2 µl de la muestra correspondiente.

**Paso 5a.** Las reacciones así preparadas se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del control de proceso en primer lugar.

**Tabla 2: Perfil de temperatura para generar amplicones o productos de PCR del control de proceso.**

	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Temperatura (°C):	94	94	60	72	72
Tiempo (min:seg):	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00

**Fuente: Autor**

**Paso 5b.** Las reacciones preparadas con los primers FAP59/FAP64 se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del material genético de los BPV causales en la lesión.

**Tabla 3: Perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BPV**

	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
<b>Temperatura (°C):</b>	94	94	52	72	72
<b>Tiempo (min:seg):</b>	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00

**Fuente: Autor**

**Paso 6.** Las reacciones tanto del control de proceso como para la detección del material genético de los BPV posterior a ser sometidas al proceso de amplificación se les adicionó 5 µl de la Solución buffer de carga para ADN 6X. Se mezclaron ambas soluciones.

**Paso 7.** De la mezcla de cada una de las reacciones de PCR con la Solución buffer de carga para ADN 6X se tomó 10 µl, los cuales fueron cargados en uno de los pocillos de un gel de agarosa al 1.2% preparado con Buffer TAE 1X y 1 µl de la Solución de Bromuro de Etidio a 10 mg/ml por cada 30 ml del gel. En uno de los pozos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

**Paso 7.** Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo al mismo a 90 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel.

**Paso 8.** Una vez resueltos los productos de los PCR, se fotodocumentaron para su análisis.

**Paso 9.** Se consideró como muestras válida toda aquella en la que se logró amplificar el fragmento correspondiente al control de proceso. Y como muestra positiva, toda aquella que mostró un producto de PCR de un tamaño entre 400 a 500 bp.

**3.7. Materiales usados para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV de las muestras positivas, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4).**

### 3.7.1 Biológicos

Muestras de ácidos desoxirribonucleico (ADN) total puro, de las muestras de tejidos positivos a la amplificación de material genético de los BPV.

### 3.7.2. Reactivos y soluciones

Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502). Se preparación de alícuotas de 1 ml y se almacenaron a temperatura ambiente protegidas del polvo.

**Enzima Taq ADN polimerasa** (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033), con la **Solución buffer de amplificación 10X** y la **Solución a 50 mM de MgCl<sub>2</sub>**. Se prepararon alícuotas de las soluciones y se almacenaron a -20 °C, protegidas de la luz directa.

**Solución de dNTP's 10 mM** de cada uno (Trifosfato de Desoxinucleotidos) (dNTP's set, Thermo scientific, Cat. No.: R0182). Se prepararon alícuotas y se almacenaron -20 °C y protegidas de la luz directa.

**Solución de oligonucleótidos o primers 100 µM** (Invitrogen). Par de oligonucleótidos específicos para la detección de material genético de los BPV (FAP59For: **TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT**, FAP64Rev: **CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC**).

**Soluciones de ADN total:** ADN total de muestras positivas a la determinación de la presencia de material genético de BPV, siguiendo el proceso antes descrito (**Sección 7.6**). Las alícuotas se mantuvieron almacenadas a -20°C y protegidas de la luz directa.

**Agarosa** (Invitrogen, Cat. No. 16500-100).

**Solución buffer TAE 1X** (Solución de 40 mM Tris-acetato, pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA).

**Solución de Bromuro de Etidio** (Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, Cat. No: E7637).

**Solución Buffer de carga para ADN 6X** (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 60 mM de EDTA. 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, Cat. No: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, Cat. No: X4126) y 60 % de Glicerol

**Marcador de peso molecular para ADN** (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, Thermo scientific Cat. No.: SM0321).

**Enzima de restricción *DdeI*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER1882)

**Enzima de restricción *HinfI*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER0801)

**Enzima de restricción *MslI*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER2001)

**Enzima de restricción *HindIII*** (Thermo scientific, Cat. No.: ER0501)

### 3.7.3. Equipos y otros materiales

**Set de micropipetas** (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)

**Vortex.**

**Microcentrifuga refrigerada.**

**Cabina de PCR.**

**Termociclador Nexus** (Eppendorf).

**Congelador a -20°C**, sin descongelamiento automático (Almacenado de enzimas y algunos otros reactivos).

**Incubadora bacteriológica a 37 °C.**

**Fuente de poder.**

**Cámara de electroforesis horizontal.**

**Balanza analítica** (Mantener calibrada).

**Horno de microondas.**

**Transiluminador UV.**

Fotodocumentador UV-Impresora.

Potenciómetro (pHmetro).

Platina de agitación y calentamiento.

**3.8. Métodos aplicados en la realización del proceso para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP, y su detección mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE (Actividad experimental número 4).**

### 3.8.1. Pasos ejecutados

**Paso 1.** Se descongelaron los reactivos necesarios para la amplificación (Agua grado biología molecular, Solución buffer de amplificación 10X, Solución de dNTP's, Solución de  $MgCl_2$ , Soluciones de oligonucleótidos y las Soluciones de ADN total correspondientes a las muestras positivas a la presencia de material genético de los BPV).

**Paso 2.** Una vez descongelados todos los reactivos necesarios, se preparó una premezcla con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (25  $\mu l$  de volumen final por reacción), colocando en el orden indicado los siguientes reactivos, con la excepción de las muestra de ADN total:

**Tabla 4: Preparación de la premezcla para la amplificación de los productos de PCR específicos de los BPV, su genotipificación mediante el ensayo RFLP.**

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	por reacción:	de premezcla*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	18.65 $\mu l$	18.65 $\mu l$ X n
Solución buffer de amplificación 10X	10X	1X	2.5 $\mu l$	2.5 $\mu l$ X n
Solución de dNTP's	10 mM	0.1 mM	0.5 $\mu l$	0.5 $\mu l$ X n
Solución de $MgCl_2$	50 mM	2.0 mM	1.0 $\mu l$	1.0 $\mu l$ X n
Oligonucleótido FAP59For	100 $\mu M$	0.8 $\mu M$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$ X n
Oligonucleótido FAP64Rev	100 $\mu M$	0.8 $\mu M$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$ X n
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/ $\mu l$	0.04 U/ $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$ X n
Muestra de ADN total	---- $\mu g/\mu l$	---- $\mu g/\mu l$	2.0 $\mu l$	2.0 $\mu l$ X n
Volumen final:	-----	-----	25 $\mu l$	25 $\mu l$ X n

\* n = Número de muestras.

**Fuente: Autor**

**Paso 3.** La premezcla preparada se mezcló en el vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

**Paso 4.** Se marcaron los tubos de PCR (200  $\mu l$ ) y les fue colocado 23  $\mu l$  de la premezcla y se les adicionó 2  $\mu l$  de la muestra correspondiente.

**Paso 5.** Las reacciones así preparadas se colocaron en el termociclador y fueron sometidas al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR de los BPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.

**Tabla 5: Perfil de temperatura para generar los productos de PCR de los BPV para ser evaluados mediante el ensayo RFLP.**

	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
<b>Temperatura (°C):</b>	94	94	52	72	72
<b>Tiempo (min:seg):</b>	05:00	00:45	00:30	00:45	05:00

**Fuente: Autor**

**Paso 6.** De cada una de las reacciones de amplificación se confirmó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.2% teñido con Bromuro de Etidio siguiendo lo ya descrito (**Paso 7, Sección 7.6**)

**Paso 7.** Una vez confirmada la presencia del los producto de PCR esperados, se tomó de cada reacción 8.5 µl y se le adición 1 µl de la Solución buffer de digestión correspondiente a cada enzima de restricción (Enzimas *Ddel*, *HinfI* y *MsLI*, Buffer Tango 10X y enzima *HindIII*, Buffer R 10X), a la mezcla se le adicionó 0.5 µl de la enzima correspondiente (5 U en total).

**Paso 8.** Junto con las reacciones así preparadas se incubaron a 37°C en una incubadora bacteriológica durante 2 h los controles de cada una de las muestras positivas, los cuales consistieron en la misma cantidad del producto de PCR (8.5 µl) con el Buffer Tango 10X y en lugar de enzima 0.5 µl de agua grado biología molecular.

**Paso 9.** Los fragmentos generados en el proceso de digestión con cada una de las enzimas de restricción fueron resueltos en un gel de agarosa-TAE al 1.6%, sometiendo al mismo a 90 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel.

**Paso 10.** Una vez resueltos los fragmentos generados, se fotodocumentaron para su análisis.

**Paso 11.** Para la identificación de cada uno de los tipos de BPV se empleó los patrones de restricción esperados (**Tabla 6**) y la imagen fotodocumentada de la electroforesis de las reacciones de digestión con las 4 enzimas y el control sin digestión.

**Tabla 6:** Patrones de RFLP esperados de cada uno de los 15 tipos de BPVo con las enzimas de restricción *Ddel*, *Hinfl*, *MsLI* y *HindIII*.

Virus:	Producto de PCR (bp)	Enzima de restricción*:			
		<i>Ddel</i>	<i>Hinfl</i>	<i>MsLI</i>	<i>HindIII</i>
BPV-1	475	264 159 52	329 146	301 174	475
BPV-2	475	316 159	329 146	475	475
BPV-3	473	319 154	473	373 87 13	473
BPV-4	469	324 145	469	469	230 182 87
BPV-5	469	469	254 145 70	469	469
BPV-6	472	321 151	384 88	373 99	472
BPV-7	484	403 81	271 119 94	484	484
BPV-8	469	469	317 152	469	322 147
BPV-9	469	316 153	344 125	469	469
BPV-10	472	319 90 63	381 91	373 99	472
BPV-11	475	420 55	407 68	370 105	475
BPV-12	469	351 118	317 152	469	469
BPV-13	475	316 109 50	329 146	475	475
BPV-14	475	475	400 75	475	475
BPV-15	469	243 226	381 88	469	469

\* Datos tomados de Carvallo *et al.*, 2006, y para el caso de los BPV tipo 14 y 15 los patrones de digestión fueron estimados por el Dr. Antonio J. Vallecillo.

#### 4. RESULTADOS

A continuación se describen los resultados obtenidos en las diferentes actividades experimentales realizadas:

##### 4.1. Colecta de muestras.

En éste trabajo para la identificación y genotipificación molecular de los diferentes tipos de BPV se colectaron *post-mortem* 53 muestras de tejido de lesiones sugestivas a papilomatosis cutánea, 40 muestras procedentes de 30 bovinos que fueron faenados en los camales municipales de Azogues, Cuenca y Paute, adicionalmente se incluyeron 13 muestras *ante-mortem* de 11 bovinos procedentes del Cantón Zaruma (Provincia de El Oro). La descripción de cada una de las muestras se describe en la **Tabla 6**.

Las muestras colectadas y mantenidas en la solución de conservación se transportaron a temperatura ambiente hasta el laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA de la Universidad de Cuenca, en donde se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento y obtención del ADN total.

**Tabla 7. Datos de las muestras recolectadas con lesiones sugestivas a papilomatosis.**

Bovino:	Raza:	Sexo:	Edad (meses):	Provincia:	Cantón:	Muestra <sup>a</sup> :		Sitio de la lesión:
						No.:	Id.:	
01	Holstein Mestiza	H	12-18	Azuay	Sigsig	1	1	Ubre
02	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Cuenca	1	2	Ubre
03	Holstein Mestiza	M	12-18	Cañar	Biblián	1	3	Pabellón auricular
04	Holstein Mestiza	H	18-24	Azuay	Girón	6	4	Morro
							5	Caña
							6	Cruz
							7	Grupa
							8	Ubre
							9	Corvejón
05	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Sigsig	1	10	Art. del encuentro
06	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Cuenca	1	11	Ubre
07	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Cuenca	1	12	Ubre
08	Holstein Rojo	M	18-24	Azuay	Cuenca	1	13	Cuello
09	Holstein Mestiza	M	18-24	Cañar	Biblián	1	14	Cuello
10	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Cuenca	1	15	Ubre
11	Holstein Mestiza	H	18-24	Cañar	Biblián	1	16	Ubre
12	Holstein Mestiza	H	> 24	Tungurahua	Ambato	1	17	Ubre
13	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Santa Isabel	1	18	Ubre
14	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	San Fernando	2	19	Ubre
							20	Grupa
15	Holstein Mestiza	H	> 24	Cañar	Biblián	1	21	Ubre
16	Holstein Mestiza	H	18-24	Cañar	Cañar	1	22	Vulva
17	Holstein Mestiza	H	18-24	Cañar	Biblián	1	23	Ubre
18	Holstein Mestiza	M	18-24	Cañar	Cañar	1	24	Región ocular
19	Holstein Mestiza	H	> 24	Cañar	Biblián	1	25	Ubre
20	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	San Fernando	3	26	Muslo

## - Continuación tabla 7: Datos de las muestras recolectadas.

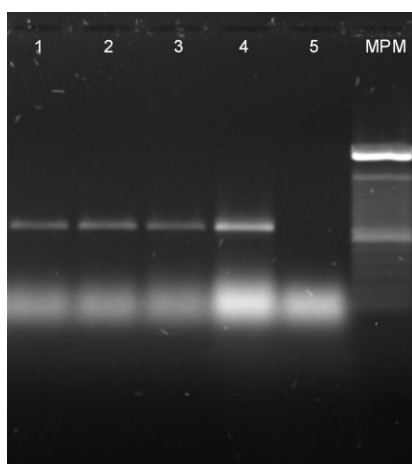
							28	Ubre
21	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Patamarca	2	29	Grupa
							30	Ubre
22	Holstein Mestiza	H	> 24	Tungurahua	Ambato	1	31	Ubre
23	Holstein Mestiza	H	18-24	Tungurahua	Ambato	1	32	Ubre
24	Holstein Mestiza	H	>24	Cañar	Cañar	1	33	Ubre
25	Holstein Mestiza	H	>24	Azuay	Cuenca	1	34	Ubre
26	Holstein Mestiza	H	>24	Cañar	Azogues	1	35	Ubre
27	Holstein Mestiza	H	18-24	Cañar	Azogues	1	36	Ubre
28	Holstein Mestiza	H	>24	Tungurahua	Ambato	1	37	Ubre
							38	Ubre
29	Holstein Mestiza	H	>24	Cañar	Biblián	2	39	Grupa
30	Holstein Mestiza	H	>24	Azuay	Cuenca	1	40	Ubre
31	Holstein Mestiza	H	12-18	El Oro	Zaruma	1	41	Art. del encuentro
32	Brown Suis	H	18-24	El Oro	Zaruma	1	42	Pabellón auricular
33	Holstein Mestiza	H	18-24	El Oro	Zaruma	1	43	Cuello
34	Holstein Mestiza	H	18-24	El Oro	Zaruma	1	44	Muslo
35	Holstein Mestiza	H	>24	El Oro	Zaruma	1	45	Ubre
36	Jersey	H	18-24	El Oro	Zaruma	1	46	Grupa
37	Jersey	H	>24	El Oro	Zaruma	1	47	Muslo
38	Jersey	H	12-18	El Oro	Zaruma	1	48	Cuello
							49	Morro
39	Holstein Rojo	H	6-12	El Oro	Zaruma	2	50	Cuello
							51	Cuello
40	Holstein Mestiza	H	12-18	El Oro	Zaruma	2	52	Pabellón auricular
41	Girolando	M	6-12	El Oro	Zaruma	1	53	Cuello
Total de muestras colectadas:						53		

Fuente: Autor

**4.2. Detección de material genético de los BPV.**

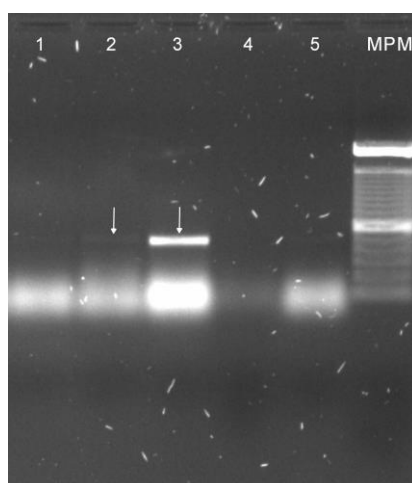
En con la aplicación de los protocolos de procesamiento y purificación de ADN total se logró obtener ADN total de 52 muestras de las 53 colectadas. De estas 52 muestras en 51 de ellas se logró obtener el amplicón en el ensayo de PCR correspondiente al control de proceso (**Figura 1**). De las 51 muestras válidas, es decir, que se logró obtener ADN total susceptible de ser amplificado, en 18 se observó un producto de PCR con un tamaño similar al esperado cuando se emplean los primers FAP59-FAP64, por lo que se les consideró como muestras positivas a la presencia de material genético de BPV (**Figura 2 y Tabla 8**).





**Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes al control de proceso.** Carriles 1, 2, 3, 4: Productos de PCR; Carril 5: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder).

**Fuente: Laboratorio de Biología molecular (Universidad de Cuenca).**



**Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a muestras positivas a la presencia de material genético de BPV.** Carriles 1 y 4: Muestras con resultado negativo; Carriles 2 y 3: Muestras con resultado positivo; Carril 5: Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). Los productos de PCR ( $\pm$  470 bp) correspondientes a generados en las muestras positivas están indicados por las flechas.

**Fuente: Laboratorio de Biología molecular (Universidad de Cuenca).**

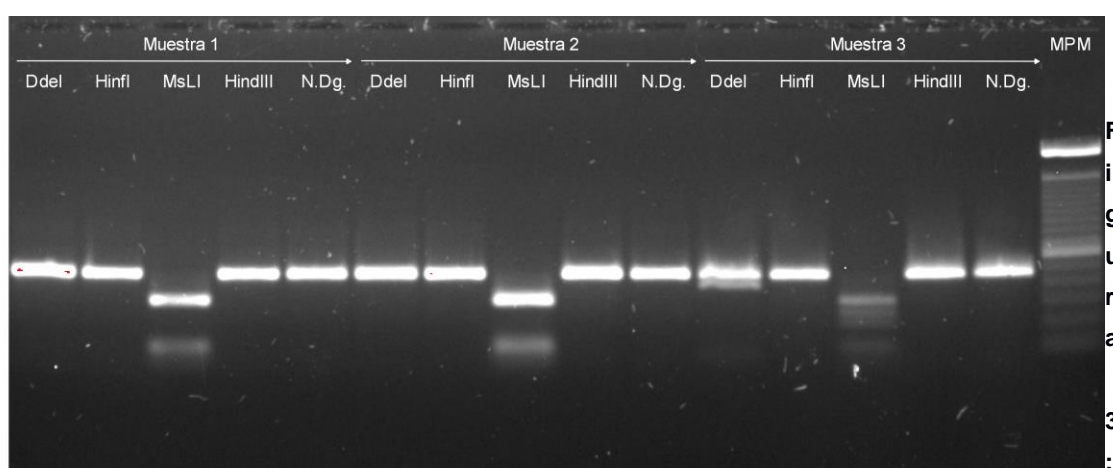
#### 4.3. Tipos de BPV identificados en las muestras positivas.

Las 18 muestras positivas fueron reamplificadas para la detección de material genético y los productos de PCR obtenidos se sometieron al análisis mediante el ensayo de RFLP (**Figura 3**). Con el ensayo de RFLP se logró genotipificar la presencia de 4 tipos diferentes de BPV en 6 de las 18 muestras (BPV-3 en 2 muestras, BPV-6 en 2 muestras, BPV-7 y BPV-9 en 1 muestra respectivamente). En 2 muestras de las 18 no fue posible identificar un tipo de patrón de

restricción claro, lo cual sugiere que puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión. En las 10 muestras restantes se logró visualizar claramente 4 tipos de patrones de restricción, que no corresponden a los predichos para cada uno de 15 tipos de BPV previamente descritos (**Tabla 6**). En patrón de restricción nuevo que se denominó 1, fue el más frecuente en las muestras positivas (7 de 18), y para los patrones nuevos 2, 3, y 4, se encontró una muestra para cada uno de ellos.

En las muestras que no se logró identificar el tipo o los tipos de virus causales de las lesiones, ya sea por que pueden corresponder a una coinfección (mezcla de virus), nuevos tipos de BPV (Nuevos patrones de restricción) en futuros estudios se procederá a clonar los productos de PCR para ser sometidos a secuenciación. Y si las secuencias obtenidas no corresponden a las previamente reportadas, se procederá a amplificar y clonar los genomas completos para secuenciarlos, lo que podría informarnos de si se trata de BPV no descritos previamente.

Para el caso de las muestras en las que se logró identificar el tipo de BPV que causó la lesión, éstas se colectaron de regiones corporales diversas, como se muestra en la **Tabla 7**.



**Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de los perfiles de digestión de los productos de PCR de muestras positiva a BPV (RFLP).** Para cada una de las muestras 1, 2 y 3; Carril Ddel: Producto de PCR digerido con la enzima *Ddel*; Carril HinfI: Producto de PCR digerido con la enzima *HinfI*; Carril MsLI: Producto de PCR digerido con la enzima *MsLI*; Carril N.Dg. Producto de PCR no digerido y Carril MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder.

**Fuente: Laboratorio de Biología molecular (Universidad de Cuenca).**

**Tabla 8:** Resultados de la identificación de material genético de los BPV presente en lesiones de papilomatosis cutánea y su genotipificación.

Bovino:	Muestra:	Control de proceso:	Detección de BPV y genotipificación:		
			PCR:	RFLP:	Tipo de BPV:
1	1	No valida			
2	2	Valida	Negativo		
3	3	Valida	Positivo	Identificable	BPV - 3
4	4	Valida	Positivo	Identificable	BPV - 6 más otro no identificable
	5	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)
	6	Valida	Positivo	No identificable	Probable mezcla (M-1)
	7	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)
	8	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)
	9	Valida	Negativo		
5	10	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)
6	11	Valida	Positivo	Identificable	BPV - 7
7	12	Valida	Negativo		
8	13	Valida	Negativo		
9	14	Valida	Negativo		
10	15	Valida	Negativo		
11	16	Valida	Negativo		
12	17	Valida	Negativo		
13	18	Valida	Negativo		
14	19	Valida	Negativo		
	20	Valida	Negativo		
15	21	Valida	Negativo		
16	22	Valida	Negativo		
17	23	Valida	Negativo		
18	24	Valida	Negativo		
19	25	Valida	Negativo		
20	26	Valida	Negativo		
	27	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-3)
	28	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-2)
21	29	Valida	Negativo		
	30	Valida	Negativo		
22	31	No valida	-		
23	32	Valida	Negativo		
24	33	Valida	Negativo		
25	34	Valida	Negativo		
26	35	Valida	Negativo		
27	36	Valida	Negativo		
28	37	Valida	Negativo		
29	38	Valida	Negativo		
	39	Valida	Negativo		
30	40	Valida	Positivo	No identificable	Probable mezcla (M-2)
31	41	Valida	Negativo		
32	42	Valida	Positivo	Identificable	BPV - 3
33	43	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)

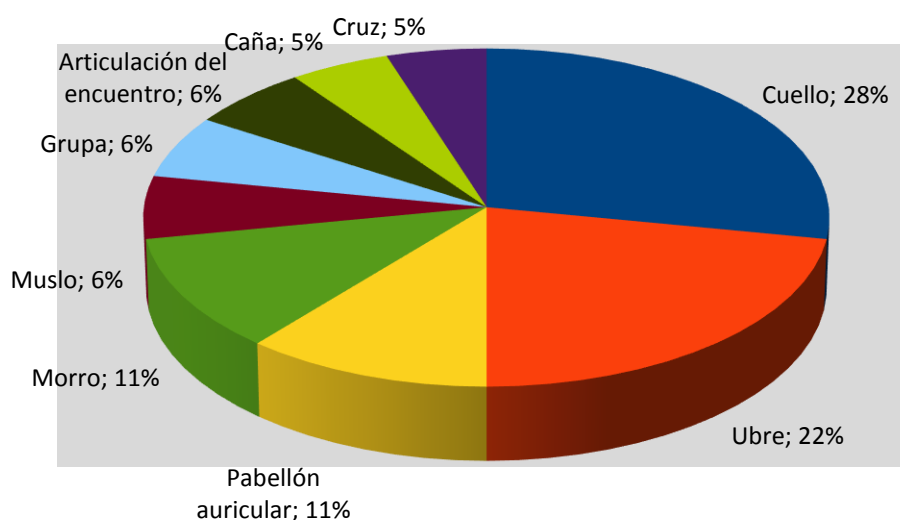
- Continuación tabla 8: Resultados de la identificación de material genético de los BPV.

34	44	Valida	Negativo		
35	45	Valida	Negativo		
36	46	Valida	Negativo		
37	47	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)
38	48	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-4)
39	49	Valida	Positivo	Identificable	RFLP no compatible con los descritos (PR-1)
	50	Valida	Negativo		
40	51	Valida	Positivo	Identificable	BPV - 6
	52	Valida	Negativo		
41	53	Valida	Positivo	Identificable	BPV - 9

Fuente: Autor.

#### 4.4. Distribución de la localización de las lesiones positivas a BPV.

La mayor cantidad de lesiones positivas a los BPV se encontraron en el cuello ( $n = 5$ ), seguido de la ubre ( $n=4$ ), pabellón auricular ( $n=2$ ), morro ( $n=2$ ). Las otras lesiones en las que se identificó material genético de los BPV se ubicaron en el muslo, articulación del encuentro, grupa, finalmente en la caña y cruz ( $n=1$ ) respectivamente (**Figura 4** y **Tabla 9**).



**Figura 4:** Proporción de las muestras positivas a la presencia de material genético de los BPV de acuerdo a su localización.

Fuente: Autor

Tabla 9: Distribución de la localización de las lesiones positivas a BPV.

Bovino:	Raza:	Sexo:	Edad (meses):	Provincia:	Cantón:	Muestra <sup>&amp;</sup> :		Sitio de la lesión:
						No.:	Id.:	
03	Holstein Mestiza	M	12-18	Cañar	Biblián	1	3	Pabellón auricular
							4	Morro
							5	Caña
							6	Cruz
04	Holstein Mestiza	H	18-24	Azuay	Girón	6	7	Grupa
							8	Ubre
							10	Art. del encuentro
							11	Ubre
05	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Sigsig	1	27	Cuello
							28	Ubre
06	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	Cuenca	1	40	Ubre
							42	Pabellón auricular
20	Holstein Mestiza	H	> 24	Azuay	San Fernando	1	43	Cuello
							47	Muslo
30	Holstein Mestiza	H	>24	Azuay	Cuenca	1	48	Cuello
32	Brown Suis	H	18-24	El Oro	Zaruma	1	49	Morro
33	Holstein Mestiza	H	18-24	El Oro	Zaruma	1	51	Cuello
37	Jersey	H	>24	El Oro	Zaruma	1	53	Cuello
38	Jersey	H	12-18	El Oro	Zaruma	1		
39	Holstein Rojo	H	6-12	El Oro	Zaruma	2		
40	Holstein Mestiza	H	12-18	El Oro	Zaruma	2		
41	Girl Orlando	M	6-12	El Oro	Zaruma	1		
Total de muestras colectadas:						53		

## 5. DISCUSIÓN

En esta investigación se tuvo por objetivo principal, mediante la aplicación de las técnicas de biología molecular PCR y RFLP, lograr la identificación de los diferentes tipos de BPV, así como determinar la frecuencia, y la localización de los papilomas en el cuerpo de los animales faenados en los camales de Azogues, Cuenca y Paute. Para ello se recolectaron 53 muestras de tejido procedentes de lesiones de diferentes partes del cuerpo de 41 bovinos, 11 de los cuales se obtuvieron *ante-mortem* de animales de la provincia de El Oro.

Con el proceso de obtención de ADN total se logró obtener ADN de 52 muestras de las 53 colectadas. De estas 52 muestras de ADN total en 51 de ellas se logró obtener un amplicón en el ensayo de PCR correspondiente al control de proceso.

De las 51 muestras válidas, en 18 se logró observar un producto de PCR con un tamaño cercano al esperado cuando se emplearon los oligonucleótidos o primers FAP59/FAP64, por lo que se les consideró como muestras positivas a la presencia de material genético de BPV, los representa el 35.29 %. De las muestras positivas ( $n = 18$ ) se logró identificar la presencia de 4 tipos diferentes de BPV, en 6 de las 18 muestras (BPV-3 y BPV-6 en 2 muestras, BPV-7 y BPV-9 en 1 muestra). En 2 muestras no fue posible identificar un tipo de patrón de restricción claro, lo cual puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión. En las 10 muestras restantes se logró visualizar claramente 4 tipos de patrones de restricción, que no corresponden a los predichos para cada uno de 15 tipos de BPV previamente descritos. El patrón de restricción nuevo que se denominó 1, fue el más frecuente en las muestras positivas (En 7 de 18, 38.88%), y para los patrones nuevos 2, 3, y 4, se encontró en una muestra para cada uno de ellos (5.55%).

En 33 muestras del estudio no se logró generar productos de PCR con los oligonucleótidos FAP59-FAP64, sin embargo la no amplificación no fue debida a la presencia de algún inhibidor o carencia de ADN, puesto que al emplear oligonucleótidos que detectan material genético de bovino si se generó el producto de PCR con el tamaño esperado.

A pesar de que las lesiones colectadas son sugestivas de ser consecuencia de la infección por BPV, estos podrían no ser detectados a consecuencia de que los oligonucleótidos FAP59-FAP64 no tienen la capacidad de hibridar en el ADN genómico de todos los BPV y por lo tanto amplificar el material genético de los tipos de BPV causales de éstas lesiones (Antonsson & Hansson, 2002). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que con los oligonucleótidos FAP59-FAP64 no se puede identificar la presencia de todos los diferentes tipos de BPV causales de lesiones en los animales.

En una investigación realizada por Araldi *et al.*, (2015), encuentran que los papilomas se encuentran con mayor frecuencia en los sitios anatómicos que tienen mayor riesgo de sufrir

abrasiones, como en la papada y el dorso. Al contrastar lo descrito por Araldi *et al.*, (2015) con los resultados obtenidos en éste trabajo en relación a la ubicación de las lesiones hay coincidencias, las lesiones positivas a la presencia de material genético de los BPV se encontraron con mayor frecuencia en el cuello (28%), seguido de la ubre (22%), y en la misma proporción en el pabellón auricular y el morro (11%), respectivamente.

En el mismo trabajo de Araldi *et al.*, (2015), mediante diagnóstico con herramientas de biología molecular la presencia de los BPV tipo 2, 3, 5, 9 y la presencia de un virus putativo BR/UCL2 9 en muestras procedentes de animales adultos, mientras que se reveló la ausencia de infección viral en los seis terneros incluidos en el estudio. Con respecto a los tipos de BPV, si tiene la coincidencia en los tipos 3 y 9 que se lograron identificar en las lesiones colectadas en éste trabajo de investigación. Y por otro lado los animales que con mayor tendencia tienden a padecer papilomatosis bovina son los adultos, es decir los que tienen edades superiores a los 12 meses. Pues queda demostrado que aquellos animales menores al año y los terneros tienen menor tendencia a padecer esta enfermedad ya que el sistema inmune de los mismos puede provocar la regresión de la infección.

Otra investigación que obtiene datos similares en la detección de los tipo de virus y que se tienen coincidencias con el actual estudio es el de Tozato *et al.*, (2012), en donde se describe la caracterización clínica, histopatológica y virológica de la papilomatosis en las tetas de rebaños de ganado lechero en Brasil, en las que se identifica 4 tipos de BPV (BPV tipo 6, 7, 9 y 10); es en este estudio en el que se detectó por primera vez el BPV tipo 7 en el ganado vacuno de Brasil.

En la actual investigación se demostró la presencia de 3 virus que coinciden con los descritos por Tozato *et al.*, (2012) y que son los BPV tipo 6, 7 y 9. Interesantemente, el BPV tipo 7 que se identificó en éste trabajo de investigación fue en una muestra de tejido con papilomas localizados en la glándula mamaria de una vaca de proveniente de la provincia del Azuay, y de mayor de 24 meses. Varios reportes sugieren que en los hatos lecheros las vacas en producción tienen mayor tendencia a presentar la infección en la ubre (Campo, 2002; Ogawa *et al.*, 2004, Maeda *et al.*, 2007).

Ogawa *et al.*, (2007) y Hatama *et al.*, (2008) en sus estudios referentes a la identificación de los BPV tipo 9 y 10, han descrito que estos tipos virales se detectan fácilmente de forma frecuente en papilomas del pezón pero no de la piel sana de las tetas. Esta observación se correlaciona con otros hallazgos y confirman la asociación específica de estos tipos de virus (Ogawa *et al.*, 2004, Maeda *et al.*, 2007; Hatama *et al.*, 2008). Por otro lado, estos tipos de papiloma en el pezón tienen un alto potencial tumorigénico cuando son causados por el BPV tipo 9 (Hatama *et al.*, 2009).

En un estudio desarrollado por He *et al.*, (2013) en pieles enfermas mediante PCR con los primers degenerados FAP59/FAP64, secuenciación y análisis filogenético, mostró que las infecciones

fueron causadas por una variante de BPV tipo 3 considerado como un nuevo subtipo de BPV (BPV / CHI-SW1, asignado al género Xlpapilomavirus). En éste reporte se identificaron infecciones mixtas, lo cual ya se descrito en otros estudios (Diniz *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2012), que indican que en los papilomas en forma de hojas y de forma plana se pueden encontrar simultáneamente los BPV tipo 6, 9 y 10. Sin embargo, también se han detectado los BPV tipo 3/SW03 y BPV/CHI-SW1 en papilomas en forma de hojas y de pezón, en lugar de BPV tipo 6, 9 y 10 (Maeda *et al.*, 2007; Hatama *et al.*, 2008). En el caso de éste estudio, también se encontraron lesiones (n = 3) en la que los patrones de restricción sugieren la presencia de infecciones múltiples, en el caso de una de esas muestras se logró determinar la presencia de material genético del BPV tipo 6.

Como lo han informado Carvalho *et al.*, 2012), los resultados sugieren que la infección por BPV no no causan infecciones de ubicación específica en el cuerpo del animal. En el presente estudio se encontró un patrón de restricción (PR-1) muy frecuente (7/18 muestras), y que no corresponde a ningún BPV previamente descrito; éste patrón de restricción 1 se localizó en muestras de lesiones localizadas el cuello, muslo, articulación del encuentro, caña, grupa y la ubre. Por lo que éste tipo de virus se puede considerar que no tiene un tropismo hacia un tejido en particular y puede ser el responsable de la mayoría de las lesiones encontradas en los animales sacrificados en los camales de Azogues, Cuenca y Paute.

En las muestras que no se logró identificar el tipo o los tipos de virus causales de las lesiones se deberá clonar los productos de PCR del ADN genómico de los BPV, para ser sometidos a secuenciación. Y las secuencias obtenidas de éstos productos de no corresponder a las previamente reportadas se deberá proceder a clonar los genomas completos para secuenciarlos, lo que podría informarnos de que tipo de BPV se trata.

Con las técnicas moleculares para la detección e identificación de los tipos de BPV ya establecidas en el laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca se continuará la colecta de muestras de animales con lesiones sugestivas a papilomatosis para ampliar el número de datos y con ello contar con una mejor definición de la diversidad y frecuencia de los BPV que afectan a los bovinos en el país; ésta información fundamentará el desarrollo de herramientas profilácticas y terapéuticas específicas para los tipos de BPV que circulan.



## 6. CONCLUSIONES

- Luego de haber desarrollado la presente investigación en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en la que se efectuó la recolección de 40 muestras *post-mortem* de lesiones sugestivas de papilomatosis bovina, de 30 bovinos faenados en los camales de Azogues, Cuenca y Paute, además se recolectaron 13 muestras *ante-mortem* de 11 animales de la provincia de El Oro.
- A las muestras antes indicadas se les implementaron técnicas de biología molecular (ensayos de PCR y RFLP), a través de las que se logró obtener ADN, detectar y genotipificar los diferentes tipos de virus de papiloma bovino.
- Las muestras detectadas y genotipificadas corresponden a las zonas del cuerpo que se detallan a continuación; cuello, ubre, morro, pabellón auricular, Muslo; grupa, articulación del encuentro, Caña y Cruz. En estas muestras se encontró con mayor frecuencia a los BPV tipo 3 y 6 seguido de los tipos 7 y 9. En dos muestras no fue posible identificar un tipo de patrón de restricción claro, lo cual puede corresponder a mezclas de virus que están causando la lesión. Mientras que en las 10 muestras restantes se logró visualizar claramente 4 tipos de patrones de restricción, uno de los cuales se encontró en 7 de las 18 muestras que no corresponden a los predichos para cada uno de 15 tipos de BPV previamente descritos.
- También se logró establecer que los bovinos con mayor tendencia a padecer papilomatosis bovina son los de raza Holstein mestiza y Holstein roja; así como también se determinó que la mayor parte de las lesiones corresponden a hembras, ya que se ubican a nivel de las ubres y tetillas. Además se observó que los bovinos con edad superior a los 24 meses, en comparación con los bovinos que tienen edades superiores a los 12 meses. Por lo que se puede decir que las lesiones provocadas por BPV son más evidentes en bovinos adultos.

## 7. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Clonar los productos de PCR de las muestras en las que no se logró determinar el tipo de BPV presente, para ser sometidos a secuenciación, y si luego de este proceso no se logra corresponder a las previamente reportadas, será necesario que se clonen los genomas completos para determinar la secuencia de los mismos y así obtener información necesaria que permita determinar si se trata de BPV no descritos.

Con las técnicas moleculares para la detección e identificación de los tipos de BPV ya establecidas en el laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca se deberá continuar con la colecta de muestras de animales con lesiones sugestivas a papilomatosis, para ampliar el número de datos y con ello contar con una mejor definición de la diversidad y frecuencia de los BPV que afectan a los bovinos en el país; ésta información fundamentará el desarrollo de herramientas profilácticas y terapéuticas específicas para los tipos de BPV que circulan en el Ecuador.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, J. M., & C. Alvarado. (2006). Hematuria vesical bovina (UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO). Zaruma, Povincia de El Oro: Digrafica S.A.
- Al-Ani F.K., O.F. Al-Rawashdeh, N.K. Hailat & A. Shotar. (2000). Cutaneous papillomatosis in horses: Response of horses to autogeneuous wart vaccine. Veterinarski Arhiv. 70(69), 331-337.
- Anjos B.L., S.A. Silva, A. DiefenbachI, M.F. Brito, G.S. Seppa & C.S. Brum. (2010). Equine sarcoid associated with bovine papillomavirus BR-UEL-4. Ciencia Rural. 40(6), 1456-1459.
- Antonsson, A. & B.G. Hansson. (2002). Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. J Virology, 76(24), 12537-12542.
- Araldi R.P., T.C. Melo, N. Diniz, J. Mazucchelli-de-Souza, R.F. Carvalho, W. Beçak & R.C. Stocco.(2013). Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. Biomed Res Int. 2013: 630.683.
- Araldi, R.P., R.F. Carvalho, J. Mazzuchelli-de-Souza, D.S. Morena, W. Becak & R.C. Stocco. (2014). Bovine papillomavirus in beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. Genet Mol Res. 13(3), 5644-5653. DOI :10.4238/2014.July.25.20.
- Araldi, R.P., T.C. Melo, A.C. Neves, D.D. Spadacci-Morena, R.F. Magnelli, D.G. Modolo, P.L. de-Sá-Júnior, J. Mazucchelli-de-Souza, R.F. Carvalho, W. Beçak & R.C. Stocco. (2015). Hyperproliferative action of bovine papillomavirus: genetic and histopathological aspects. Genet Mol Res. 14 (4), 12942-12954. DOI: 10.4238/2015.October.21.15.
- Babaahmady, E., & K. Taherpour. (2011). Verrugas en los pezones de vacas lecheras. REDVET. 12(6), 1-6.



- Baker C.C., W.C. Phelps, V. Lindgren, M.J. Braun, M.A. Gonda & P.M. Howley. (1987). Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *Virology*. 61(4), 962-971.
- Batista M.V., M.A. Silva, N.E. Pontes, M.C. Reis, A. Corteggio, R.S. Castro, G. Borzacchiello, V.Q. Balbino & A.C. Freitas. (2013). Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Vet J*. 197(2), 368-373. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.01.019
- Bergvall M., T. Melendy & J. Archambault. (2013). The E1 proteins. *Virology*. 445(1-2):35-56. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.020
- Bernard H.U., R.D. Burk, Z. Chen, K. van Doorslaer, H. zur Hausen & E.M. de Villiers. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 401(1), 70-79. DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.002.
- Betiol J.C., S. Kignel, W. Tristão, A.C. Arruda, S.K. Santos, R. Barbieri & J. de Sousa Ribeiro Bettini. (2012). HPV 18 prevalence in the oral mucosa diagnosed with verrucous leukoplakia: cytological and molecular analysis. *J Clin Pathol*. 65, 769-770. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200673.
- Bocaneti F., G. Altamura, A. Corteggio, E. Velescu, F. Roperto, G. Borzacchiello. (2014). Bovine papillomavirus: New insights into an old disease. *Transbound Emerg Dis*. 63(1):14-23. DOI: 10.1111/tbed.12222.
- Borzacchiello G. & F. Roperto. (2008). Bovine papillomaviruses, papilomas and cancer in cattle. *Vet Res*. 39(5):45. DOI: 10.1051/vetres:2008022.
- Borzacchiello G., V. Ambrosio, S. Roperto, F. Poggiali, E. Tsirimonakis, A. Venuti, M.S. Campo & F. Roperto. (2003). Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. *J Comp Pathol*. 128(2-3), 203-206.



- Brandt S., A. Schoster, R. Tober, C. Kainzbauer, J.P. Burgstaller, R. Haralambus, R. Steinborn, C. Hinterhofer & C. Stanek. (2011). Consistent detection of bovine papillomavirus in lesions, intact skin and peripheral blood mononuclear cells of horses affected by hoof canker. *Equine Vet J.* 43(2), 202-209. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00147.x.
- Burnett S., N. Jareborg & D. DiMaio. (1992). Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proc.Natl Acad Sci USA.* 89(12), 5665-5669.
- Campo M. (2003). Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol.* 1(13-14), 1-12. DOI: 10.1046/j.1476-5829.2003.00001.x.
- Campo M.S., M.H. Moar, H.M., Laird & W.F. Jarrett. (1981). Molecular heterogeneity and lesion site specificity of cutaneous bovine papillomaviruses. *Virology.* 113(1), 323-335.
- Campo M.S., W.F. Jarrett, R.O. Barron, B.W. Neil & K.T. Smith. (1992.). Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res.* 52(24), 6898-6904.
- Cantú D. (2014). Estudio epidemiológico del Virus de papiloma bovino, caracterización y alternativas de producción de una vacuna multivalente en Tamaulipas. *Cofupro.* 1, 1-39.
- Carvalho C.C., M.V. Batista, M.A. Silva, V.Q. Balbino & A.C. Freitas. (2012). Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transbound Emerg Dis.* 59(5), 441-447. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01296.x.
- Carvalho R.F., S.T. Sakata, D.N. Giovanni, E. Mori, P.E. Brandão, L.J. Richtzenhain, C.R. Pozzi, J.R. Arcaro, M.S. Miranda, J. Mazzuchelli-de-Souza, T.C. Melo, G. Comenale, S.L. Assaf, W. Beçak & R.C. Stocco. (2013). Bovine papilloma virus in Brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *Biomed Res Int.* 2013:270898. DOI: 10.1155/2013/270898.
- Charry-Dávalos J.V. & M.F. Hinojosa-López. (2011). Estudio de papilomatosis bovina en cinco propiedades de ganadería de leche, en cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha. Quito. UDLA, Sede Ecuador, Facultad de Salud. 194 p.



- Claus M.P., M. Lunardi, A.A. Alfieri, R.A. Arellano, O.D. Sartori, M.H.P. Fungaro & A.F. Alfieri. (2009). Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. *Braz Arch Biol Technol.* 52, 93-98. DOI: 10.1590/S1516-89132009000700013.
- Claus M.P., M. Lunardi, A.F. Alfieri, D. Sartori, M.H.P. Fungaro & A.A. Alfieri. (2009). Identification of the recently described new type of bovine papillomavirus (BPV-8) in a Brazilian beef cattle herd. *Pesq Vet Bras.* 29(1), 25-28. DOI: 10.1590/S0100-736X2009000100003.
- Claus M.P., M. Lunardi, A.F. Alfieri, L.M. Ferracin, M.H. Fungaro & A.A. Alfieri. (2008). Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Vet Microbiol.* 132(3-4), 396-401. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.05.026.
- da Silva M.A., C.C. Carvalho, L.C. Coutinho, M.C. Reis, M.V. de Aragão-Batista, R.S. de Castro, F.B. Dos Anjos & A.C. de Freitas. (2012). Co-infection of Bovine papillomavirus and feline-associated Papillomavirus in bovine cutaneous warts. *Transbound Emerg Dis.* 259(6), 539-543. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01307.x.
- de Villiers E.M., C. Fauquet, T.R. Broker, H.U. Bernard & H. zur Hausen. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology.* 324(1), 17-27. DOI: 0.1016/j.virol.2004.03.033.
- Díaz R.V., C.E. Duch, A.D. Gómez, E.G. Duato, & L.B. Rico. (2012). Papilomatosis bovina: Epidemiología y diversidad de papilomavirus bovinos (BPV). *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.* 6(2), 38-57. DOI: 10.5209/rev\_RCCV.2012.v6.n2.41086
- Diniz N., T.C. Melo, J.F. Santos, E. Mori, P.E. Brandão, L.J. Richtzenhain, A.C. Freitas, W. Beçak, R.F. Carvalho & R.C. Stocco. (2009). Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res.* 8(4):1474-1480. DOI: 10.4238/vol8-4gmr668.
- Duran-Ramírez C. (2012). *Consultor clínico veterinario (Vol. 2).* Grupo Latino Editores S.A.S.
- DVan Doorslaer K., Q. Tan, S. Xirasagar, S. Bandaru, V. Gopalan, Y. Mohamoud, Y. Huyen & A.A. McBride. (2012). The Papillomavirus Episteme: A central resource for papillomavirus sequence data and analysis. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D571-8. DOI: 10.1093/nar/gks984.



- Elzein E.T., J.P. Sundberg, F.M. Housawi, A.A. Gameel, R.O. Ramadan & M.M. Hassanein. (1991). Genital bovine papillomavirus infection in Saudi Arabia. *J Vet Diagn Invest.* 3(1), 36-80.
- Lambert F., P.A. McBride & H.U. Bernard. (2013). Editorial special issue: The Papillomavirus Episteme. *Virology.* 445(1-2), 1. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.017
- Forslund, O., A. Antonsson, P. Nordin, B. Stenquist, and B. G. Hansson. (1999). A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.* 80(Part 9):2437-2443
- Ginn P.E., J.E.K.L. Mansell & P.M. Rakich. (2007). Fungal diseases of skin. p.695-708. En: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of domestic animals. Vol.1. 5th ed. Saunders Elsevier, St Louis. DOI: 10.1016/B978-070202823-6.50081-6
- Hatama S., R. Ishihara, Y. Ueda, T. Kanno & I. Uchida. (2011). Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using Xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Arch Virol.* 156(7), 1281-1285. DOI: 10.1007/s00705-011-0970-7.
- Hatama, S., K. Nobumoto, & T. Kanno. (2008). Genomic and phylogenetic analysis of bovine papilloma virus two novel, BPV-9 y BPV-10. *J Gen Virol.* 89(Pt 1), 158-63. DOI: 10.1099/vir.0.83334-0
- Hatama, S., T. Nishida, K. Kadota, I. Uchida, & T. Kanno. (2009). Bovine papillomavirus type 9 induces epithelial papillomas on the teat skin of heifers. *Vet Microbiol.* 136(3-4), 347-351. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.11.003.
- He Z., Q. Meng, J. Qiao, Y. Peng, K. Xie, Y. Liu, X. Cai, J. Zhang & C. Chen. (2013). Mixed nipple infections caused by variant of BPV3 and a putative new subtype of BPV in cattle. *Transbound Emerg Dis.* 63(1), e140-3. DOI: 10.1111/tbed.12238.
- Jarrett W.F., M.S. Campo, B.W. O'Neil, H.M. Laird & L.W. Coggins. (1984). A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: A member of a proposed new BPV subgroup. *Virology.* 136(2), 255-264.



- Jelínek F. & R. Tachezy. (2005). Cutaneous papillomatosis in cattle. *J Comp Pathol.* 132(1), 70-81.
- Johannsen E. & P.F. Lambert. (2013). Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology.* 445(1-2), 205-212. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.016.
- Johannsen E. & P.F. Lambert. (2013). Epigenetics of human papillomaviruses. *Virology.* 445(1-2), 205-212. DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.016.
- Kim K., P.A. Garner-Hamrick, C. Fisher, D. Lee & P.F. Lambert. (2003). Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J Virol.* 77(23), 12450-12459. DOI: 10.1128/JVI.77.23.12450-12459.2003.
- Leto Md., G.F. Santos Júnior, A.M. Porro & J. Tomimori. (2011). Human papillomavirus infection: Etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol.* 86(2), 306-317. DOI: 10.1590/S0365-05962011000200014.
- Love A.J., S.N. Chapman, S. Matic, E. Noris, G.P. Lomonossoff & M. Talianky. (2012). In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* 236(4)1305-1313. DOI: 10.1007/s00425-012-1692-0.
- Lunardi M., A.A. Alfieri, R.A. Otonel, B.K. de Alcântara, W.B. Rodrigues, A.B. de Miranda & A.F. Alfieri. (2013). Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol.* 162(1), 207-213. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.08.030.
- Lunardi M., B.K. de Alcântara, R.A. Otonel, W.B. Rodrigues, A.F. Alfieri & A.A. Alfieri. (2013). Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. *J Clin Microbiol.* 51(7), 2167-2171. DOI: 10.1128/JCM.00371-13.
- Maeda Y., T. Shibahara, Y. Wada, K. Kadota, T. Kanno, I. Uchida & S. Hatama. (2007). An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet Microbiol.* 121(3-4), 242-248. DOI: 10.1016/j.vetmic.2006.12.015.
- Marins R.S.Q.S. & Ferreira C.E.P. (2011). Clinic pathologic and epithelial regression study in cutaneous warts of bovines infected by papillomavirus. *IRJPP.* 1(1), 012-016.





- McBride A.A., N. Sakakibara, W.H. Stepp & M.K. Jang. (2012). Hitchhiking on host chromatin: How papillomaviruses persist. *Biochim Biophys Acta*. 1819(7), 820-825. DOI: 10.1016/j.bbagra.2012.01.011.
- Melo T.C., N. Diniz, S.R. Campos, O.P. Ferraz, C.J. Lindsey, T.T. Rieger, W. Beçak & R.C. Stocco. (2011). Cytogenetic studies in peripheral blood of bovines afflicted by papillomatosis. *Vet Comp Oncol*. 9(4), 269-274. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2011.00263.x.
- Monteiro V., M. Coelho, A. Carneiro, R. Silva, M. Teixeira, A. Wanderley A, E. Wanderley & E. Franco. (2008). Clinical and histopathological description of bovine cutaneous papillomatosis (BPV) / Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciênc Anim Bras*. 10:550-560.
- Munday J.S. (2014). Bovine and human papillomaviruses: A comparative review. *Vet Pathol*. 251(6), 1063-1075. DOI: 10.1177/0300985814537837.
- Munday J.S., C.G. Caballero & I. Howe. (2010). The same papillomavirus is present in feline sarcoids from North America and New Zealand but not in any non-sarcoid feline samples. *J Vet Diagn Invest*. 22(1), 97-100. DOI: 10.1177/104063871002200119.
- Munday J.S., N. Thomson, M. Dunowska, C.G. Knight, R.E. Laurie, & S. Hills (2015). Genomic characterization of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. *Vet Microbiol*. 177(3-4), 289-95. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.03.019.
- Nascimento G.A., E.V. Souza, D.S. Ferreira, M.S. Arruda, C.H. Castelletti, M.S. Wanderley, M.H. Ekert, D. Bruneska, & J.L. Filho. (2012). Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens Bioelectron*. 38(1), 61-6. DOI: 10.1016/j.bios.2012.04.052.
- Ogawa T., Y. Tomita, H. Okada, K. Shinozaki, H. Kubonoya, I. Kaiho & H. Shirasawa. (2004). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol*. 85(Pt 8), 2191-2197. DOI: 10.1099/vir.0.80086-0
- Ogawa T., Y. Tomita, M. Okada & H. Shirasawa. (2007). Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol*. 88(Pt 7), 1934-1938. DOI:



10.1099/vir.0.82794-0

- Orbell G.M., S. Young & J.S. Munday. (2011). Cutaneous sarcoids in captive African lions associated with feline sarcoid-associated papillomavirus infection. *Vet Pathol.* 48(6), 1176-1179. DOI: 10.1177/0300985810391111.
- Pangty K., S. Singh, R. Goswami, G. Saikumar & R. Somvanshi. ( 2010). Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. *Transbound Emerg Dis.* 57(3), 185-196. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2009.01096.x.
- Peretti V., F. Ciotola, S. Albarella, V. Russo, G.P. Di Meo, L. Lannuzzi, F. Roperto & V. Barbieri. (2007). Chromosome fragility in cattle with chronic enzootic haematuria. *Mutagénesis* 22(5), 317-320. DOI: 10.1093/mutage/gem019.
- Rector A. & M. Van Ranst. (2013). Animal papillomaviruses. *Virology.* 445(1-2), 213-223. DOI: 10.1016/j.virol.2013.05.007.
- Roperto S., J.S. Munday, F. Corrado, M. Gorla & F. Roperto. ( 2016). Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Vet Microbiol.* 190, 1-4. DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.04.007.
- Roperto S., V. Russo , A. Özkul, A. Sepici-Dincel, P. Maiolino, G. Borzacchiello, I. Esposito, I. Marcus , M.G. Riccardi & F Roperto. (2013). Bovine papillomavirus type 2 infects the urinary bladder of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and plays a crucial role in bubaline urothelial carcinogenesis. *J Gen Virol.* 94(Pt 2), 403-408. DOI: 10.1099/vir.0.047662-0.
- Roperto S., V. Russo, L. Leonardi, M. Martano, F. Corrado, M.G. Riccardi & F. Roperto. ( 2015). Bovine papillomavirus type 13 expression in the urothelial bladder tumours of cattle. *Transbound Emerg Dis.* 63(6), 628-634. DOI: 10.1111/tbed.12322.
- Ruiz V., M.V. Mozgovoij, M.J. Dos Santos & A. Wigdorovitz. (2015). Plant-produced viral bovine vaccines: what happened during the last 10 years?. *Plant Biotechnol J.* 13(8), 1071-1077. DOI: 10.1111/pbi.12440.
- Sainsbury F., E.C. Thuenemann & G.P. Lomonosoff. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol J.*



7(7), 682-693. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x.

Silva M.A., B.M. De Albuquerque, N.E. Pontes, L.C. Coutinho, M.C. Leitão, M.C. Reis, R.S. Castro & A.C. Freitas. (2013) Detection and expression of bovine papillomavirus in blood of healthy and papillomatosis-affected cattle. *Genet Mol Res.* 12(3), 3150-3156. DOI: 10.4238/2013.February.28.31.

Silva M.S., M. Weiss, M.C. Brum, B.L. Dos Anjos, F.D. Torres, R. Weiblen & E.F. Flores, 2010: Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *J Vet Diagn Invest.* 22(4), 603-606. DOI: 10.1177/104063871002200417

Somvanshi R. (2011). Papillomatosis in buffaloes: A less-known disease. *Transbound Emerg Dis.* 58(4), 327-332. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01211.x.

Stocco dos Santos R.C., C.J. Lindsey, O.P. Ferraz, J.R. Pinto, R.S. Mirandola, F.J. Benesi, E.H. Birgel, C.A. Pereira & W. Becak. (1998). Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: An experimental model. *J Gen Virol.* 79 ( Pt 9), 2127-2135. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2127.

Thuenemann C.E., A.E. Meyers, J. Verwey, E.P. Rybicki & G.P. Lomonosoff. (2013). A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: Assembly of protective bluetongue virus-like particles. *Plant Biotechnol J.* 11(7), 839-846. DOI: 10.1111/pbi.12076.

Turk N., Ž. Župančić, V. Starešina, S. Kovač, T. Babić, M. Kreszinger, S. Ćurić, L. Barbić & Z. Milas. (2005). Severe bovine papillomatosis: detection of bovine papillomavirus in tumour tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and parammunity inducer. *Veterinarski Archiv.* 75(5), 391-397.

van Dyk E., A.M. Bosman, E. van Wilpe, J.H. Williams, R.G. Bengis, J. van Heerden & E.H. Venter. (2012). Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 82(2), 80-85.

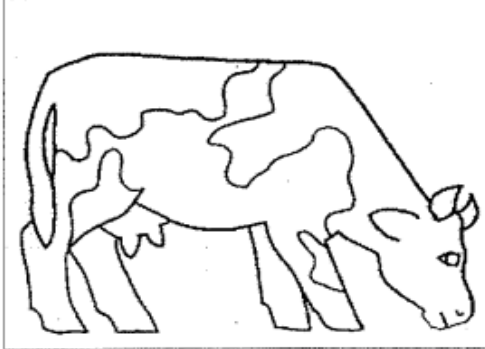
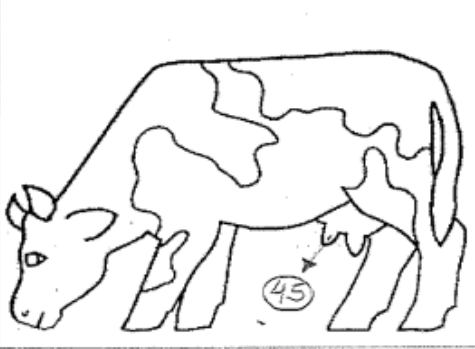
Williams J.H., E. van Dyk, P.J. Nel, E. Lane, E. Van Wilpe, R.G. Bengis, L.M. de Kler-Lorist & J. van Heerden. (2011). Pathology and immunohistochemistry of papillomavirus-associated cutaneous lesions in Cape mountain zebra, giraffe, sable antelope and African buffalo in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 82(2), 97-106.




- Yagui A., C. Carvalho, A. Freitas, L. Gustavo, B. Góes, L. Dagli, E. Birgel-Júnior, W. Beçak W & R. Stocco dos Santo. (2006). Papillomatosis in cattle: *In situ* detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz J Morphol Sci.* 23(3-4), 525-529.
- Yagui A., M.L. Dagli, E.H. Birgel Jr, B.C. Alves-Reis, O.P. Ferraz, E.M. Pituco, A.C. Freitas, W. Beçak & R.C. Stocco. (2008). Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: *In situ* hybridization and cytogenetic analysis. *Genet Mol Res.* 7(2), 487-497.
- Zheng Z.M. & C.C. Baker. (2006). Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11, 2286-2302. DOI: 10.2741/1971.
- Zhu W., J. Dong, E. Shimizu, S. Hatama, K. Kadota, Y. Goto & T. Haga. ( 2012). Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch Virol.* 157(1), 85-91. DOI: 10.1007/s00705-011-1140-7.

## 9. ANEXOS

Anexo 1: Formato para la colecta de datos de los animales muestreados.

Formulario número: 35		Fecha: 11/05/2016					
Raza: Holsteina	Identificación del animal:	Arete oficial: 9713	Edad: 0-6 meses				
Productor:	Leche: <input checked="" type="checkbox"/>	Otro arete:	6-12 meses				
Carne: <input checked="" type="checkbox"/>	Sexo: Macho	Otra identificación:	12-18 meses				
	Hembra: <input checked="" type="checkbox"/>		18-24 meses				
			> 24 meses <input checked="" type="checkbox"/>				
Propietario: Freddy Asanza		C.I.:					
Lugar de procedencia: Zaruma (E/ORO)							
Origen:	Feria:	Destino:	Feria:				
	Exposición:		Exposición:				
	Predio: <input checked="" type="checkbox"/>		Predio:				
	Otro:		Camal: <input checked="" type="checkbox"/>				
			Otro:				
Tipo de alimento:	Balanceado: <input checked="" type="checkbox"/>	Potable:	Si: <input checked="" type="checkbox"/>				
	Forraje: <input checked="" type="checkbox"/>	Rio:	No: <input type="checkbox"/>				
	Rechazo:	Acequia:	No sabe: <input type="checkbox"/>				
	Otro:	Bebederos: <input checked="" type="checkbox"/>					
Presencia de heridas en los animales:	Si: <input type="checkbox"/>	Presencia de moscas:	Si: <input checked="" type="checkbox"/>				
	No: <input checked="" type="checkbox"/>		No: <input type="checkbox"/>				
	No sabe: <input type="checkbox"/>		No sabe: <input type="checkbox"/>				
			Limpieza-desinfección de instrumental médico:				
Reproducción de los animales:	Monta: <input checked="" type="checkbox"/>	Reproducción:	Orina: <input type="checkbox"/>				
	I. artificial: <input checked="" type="checkbox"/>	Leche: <input checked="" type="checkbox"/>	Leche: <input type="checkbox"/>				
	Problemas sanitarios en:	Peso: <input type="checkbox"/>	Otro: <input type="checkbox"/>				
		Otro: <input type="checkbox"/>					
Lesiones:							
Flanco izquierdo:		Flanco derecho:					
							
Localización:							
Muestras tomadas:							
Sangre:		Tejido:		Orina:		Vejiga:	
Número:	Identif.:	Número:	Identif.:	Número:	Identif.:	Número:	Identif.:
1		1	110545	1		1	
2		2		2		2	
3		3		3		3	
4		4		4		4	
5		5		5		5	
6		6		6		6	

## Anexo 2: Formato de ensayo de PCR para la amplificación del control de proceso.

 UNIVERSIDAD DE CUENCA Cuenca 1867	Laboratorio de Biología Molecular		01-FE-MBM-TaqPol	
			Versión:	1
	Formato de ensayo: Taq ADN polimerasa		Fecha:	2016.08.23
			Página:	1 de 2

## A.- Información del ensayo:

Usuario:	Antonio V.		
Fecha:	2016.09.07	Nombre del programa:	
No:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1	12.5 Kb Mt	707-708	Control de proceso, según 12.5 de gen ribosomal del genoma mitocondrial. Bos spp.
2			
3			
4			
5			

## B.- Mezcla de reacción:

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	373 µl	18.65 µl
Tampon de amplificación 10X.	10X	1X	50 µl	2.5 µl
Solución de dNTP's.	10 mM	0.1 mM	5 µl	0.5 µl
Solución de MgCl <sub>2</sub> .	50 mM	2.0 mM	20 µl	1.0 µl
Oligonucleotido 12.5 FW-Mt-R.	100 µM	0.8 µM	4 µl	0.2 µl
Oligonucleotido 12.5 FW-Mt-R.	100 µM	0.8 µM	4 µl	0.2 µl
Oligonucleotido _____-F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido _____-R.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido _____-F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleotido _____-R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	5 U/µl	0.04 U/µl	4 µl	0.2 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	40 µl	2.0 µl
Volumen final:			µl	25 µl

## C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 35			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:		
Tiempo (min, seg):	5' - "	45"	30"	45"	5' - "	8
Temperatura (°C):	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C

## D.- Curva de temperatura de alineamiento:


No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C):												
Tubo No.:												
Tubo No.:												
Tubo No.:												

F001- PCR Taqpol ver2016.08.23.odt

Página 1 de 2



## Anexo 3: Formato de ensayo de PCR para la amplificación de material genético de los BPV.

 UNIVERSIDAD DE CUENCA Desde 1867	Laboratorio de Biología Molecular		01-FE-MBM-TaqPol	
			Versión:	1
	Formato de ensayo: Taq ADN polimerasa		Fecha:	2016.08.23
			Página:	1 de 2

## A.- Información del ensayo:

Usuario: Antonio U.			
Fecha: 2016.08.08	Nombre del programa:		
No:	Nombre del producto de PCR:	Tamaño (bp):	Observaciones:
1	BOPVL L1	± 430-460	Detección de BOPV
2			
3			
4			
5			

## B.- Mezcla de reacción:

Reactivo:	Concentración		Volumen	
	inicial:	final:	de premezcla:	por reacción:
Agua grado Biología Molecular.	No aplica.	No aplica.	323 µl	18.65 µl
Tampon de amplificación 10X.	10X	1X	50 µl	2.5 µl
Solución de dNTP's.	10 mM	0.1 mM	5 µl	0.5 µl
Solución de MgCl <sub>2</sub> .	50 mM	2.0 mM	20 µl	1.0 µl
Oligonucleótido FAP59 -F.	100 µM	0.8 µM	9 µl	0.2 µl
Oligonucleótido FAP64 -R.	100 µM	0.8 µM	9 µl	0.2 µl
Oligonucleótido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido -R.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido -F.	µM	µM	µl	µl
Oligonucleótido -R.	µM	µM	µl	µl
Enzima Taq ADN polimerasa.	5 U/µl	0.04 U/µl	4 µl	0.2 µl
Muestra de ADN total.	µg/µl	µg/µl	40 µl	2.0 µl
Volumen final:			µl	25 µl

## C.- Perfil de temperaturas de amplificación:

Paso:	Desnaturalización inicial:	Número de ciclos: 35			Extensión final:	Almacenamiento:
		Desnaturalización:	Alíneamiento:	Extensión:		
Tiempo (min, seg):	5 min	45"	30"	45"	5 min	8
Temperatura (°C):	94 °C	94 °C	52 °C	72 °C	72 °C	4 °C

## D.- Curva de temperatura de alíneamiento:

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C):												
Tube No.:												
Tube No.:												
Tube No.:												